# LYMPHOZYTENSTIMULATION DURCH EIN ANTIGEN-GEMISCH: UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANWENDBARKEIT DER SPEZIFISCHEN, POLYKLONALEN AKTIVIERUNG ALS KLINISCH-DIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODE

Heinrich Tittus

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546825_0001

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Professor Dr. med. Klaus Betke

# LYMPHOZYTENSTIMULATION DURCH EIN ANTIGEN-GEMISCH: UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANWENDBARKEIT DER SPEZIFISCHEN, POLYKLONALEN AKTIVIERUNG ALS KLINISCH-DIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Heinrich Tittus
aus
München
1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Priv.Doz.Dr.R. Eife |
| Mitberichterstatter: | Prof.Dr.K. Betke |
| Dekan: | Prof.Dr.W. Spann |

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 1982

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS


1 EINFÜHRUNG 1

2 MATERIALIEN UND METHODIK 3

2.1. Materialien 3
2.1.1. Präparate und Zubehör 3
2.1.2. Zubereitung bestimmter Präparate 4
2.1.2. Geräte 6

2.2. Methodik 7
2.2.1. Patienten und Kontrollpersonen 7
2.2.2. Lymphozyten-Stimulation 8
2.2.3. Blastentransformation 9
2.2.4. Lymphotoxin-Nachweis 10
2.2.5. Auswertung der Ergebnisse 11

3 AUSWERTUNG DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE 12

3.1. Vorversuche: Kinetik- und Dosis-Wirkungs-Untersuchungen 12
3.1.1. Antigen-Gemisch I 12
3.1.2. Antigen-Gemisch II 17
3.1.3. Antigen-Gemisch III 23
3.1.4. Vergleichende Stimulation mit drei der Einzelkomponenten 27

3.2. Stimulation von Lymphozyten einer Gruppe gesunder Personen 33
3.2.1. Stimulationsindex 33
3.2.2. Stimulationsdifferenz 37
3.2.3. Stimulationsindex und Stimulationsdifferenz 40
3.2.4. Lymphotoxin-Bildung 44
3.2.5. Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung 46
3.2.6. Definition von Normwerten 48
3.2.7. Mehrfachuntersuchungen einzelner Probanden 50

3.3. Stimulation von Lymphozyten einer Gruppe von Patienten 52
3.3.1. Stimulationsindex 52
3.3.2. Stimulationsdifferenz 55
3.3.3. Stimulationsindex und Stimulationsdifferenz 57
3.3.4. Lymphotoxin-Bildung 59
3.3.5. Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung 60
3.3.6. Mehrfachuntersuchungen einzelner Patienten 62

3.4. Untersuchungen an Patienten mit bestimmten Erkrankungen 64
3.4.1. Patienten mit Zöliakie 72
3.4.2. Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie 75

4 DISKUSSION 83

5 ZUSAMMENFASSUNG 93

6 LITERATURVERZEICHNIS 94

## 1. EINFÜHRUNG

Die Stimulation von Lymphozyten mit den sog. Mitogenen und die Messung der Proliferation der Lymphozyten/Lymphoblasten als Reaktion auf eine Stimulation in vitro ist eine wichtige Untersuchungsmethode in der Diagnostik zellulärer Immunstörungen (Ling and Kay (1975), Oppenheim and Rosenstock (1976)). Es hat sich jedoch gezeigt, daß - abgesehen von schweren zellulären Immunstörungen, wie z.B. dem DiGeorge'Syndrom (DiGeorge, 1968) - die Lymphozyten fast aller Patienten, auch solcher mit erheblichen zellulären Immunstörungen, auf eine Stimulation mit Mitogenen reagieren und daß die Grenzen zwischen normalen und pathologisch niedrigen Reaktionen fließend sind, sodaß häufig gerade partielle zelluläre Immunstörungen durch diese Untersuchungsmethode nicht erfaßt werden.

Lymphozyten sensibilisierter Personen reagieren jedoch nicht nur auf Mitogene, sondern auch auf (spezifische) Antigene mit Blastentransformation und -proliferation (Pearmain, Lycette and Fitzgerald, 1969; Hirschhorn et al., 1963; Ling and Husband, 1964): aus dieser Reaktion kann man mit Sicherheit schließen, daß die betreffende Person gegen das verwendete Antigen sensibilisiert ist und immunkompetente Zellen besitzt, die auf das Antigen reagieren können. Die Antigen-induzierte Lymphoproliferation ist eine spezifische Reaktion und ist positiv mit dem zellulären Immunstatus korreliert (Mills, 1966; Oppenheim, Wolstencroft and Gell, 1967). Reagieren die Zellen jedoch nicht, so kann das darauf beruhen, daß der Untersuchte an einer Immunstörung leidet, also keine immunkompetenten Zellen besitzt, oder aber darauf, daß er noch nicht - oder nicht genügend - sensibilisiert wurde. Um die letztere Möglichkeit auszuschließen, und um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, mit einem spezifischen Antigen zu stimulieren, gegen das bereits eine Sensibilisierung stattgefunden hat, müßte man jede Untersuchung mit einer Reihe verschiedener Antigene durchführen. Ein solches Vorgehen verlangt

das Ansetzen einer großen Zahl von Kulturen und eine große Zahl von Lymphozyten, die gerade für Untersuchungen bei Kindern häufig nicht zu gewinnen sind.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, liegt es nahe, nicht einzelne Kulturen mit jeweils einem Antigen zu stimulieren, sondern zur Stimulation ein Antigen-Gemisch zu verwenden (Caron, 1967; Schellkens and Eijsvoogel, 1971; Leguit et al., 1973; Mihalcu, Stefanescu and Platica, 1975). Dieses sollte so zusammengesetzt sein, daß mit großer Wahrscheinlichkeit der zu untersuchende Patient gegen wenigstens eine Komponente sensibilisiert ist. Ein Nicht-Ansprechen der Zellen auf die Stimulation mit einem solchen Antigen-Gemisch, ist dann mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Immunstörung und nicht auf eine fehlende Sensibilisierung zurückzuführen.

Ein Antigen-Gemisch mit den Komponenten Tetanus- und Diphterie-Toxoid, Tuberkulin, Vaccinia- und Mumps-Virus wurde 1976 von den Behring-Werken hergestellt. Bisher gab es noch keine systematische Untersuchung über die klinische Anwendbarkeit des Präparates in der Immundiagnostik. Eine solche Untersuchung wurde 1979 vom Immunologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik München begonnen: bei gesunden Personen und bei Patienten mit verschiedenen primären und sekundären Immunstörungen, aber auch nicht immunologischen Erkrankungen wurde das Ansprechen und die Reaktion der Lymphocyten auf das Antigen-Gemisch in vitro geprüft.
In dieser Arbeit werden die vom Immunologischen Labor erarbeiteten Daten ausgewertet:
Als Parameter für die Reaktion wird neben der Blastentransformation auch die Lymphotoxin-Sekretion, also zwei verschiedene Lymphozyten-Funktionen berücksichtigt.
Die Untersuchungen sollten zunächst Normwerte für die Stärke der Reaktion festlegen und den Anteil nicht-reagierender Personen in einem Kollektiv gesunder Probanden feststellen und dann klinische Situationen (Patienten mit bestimmten Erkrankungen und unter immunsuppressiver Therapie) herausfinden, in denen keine oder eine stark abgeschwächte Reaktion auf die Antigen-Stimulation erkennbar sind.

## 2. MATERIALIEN UND METHODIK

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Präparate und Zubehör

In den Versuchen wurden folgende Präparate und folgendes Zubehör verwendet:

Medium RPMI 1640 (GIBCO, Glasgow, Schottland)
Penicillin G (GIBCO, Glasgow, Schottland)
Streptomycin (GIBCO, Glasgow, Schottland)
Eagle's Minimum Essential Medium (FLOW, Bonn)
Fetales Kälberserum (FLOW, Bonn)
Glutamin (FLOW, Bonn)
Trypsin (FLOW, Bonn)
Humanserum (Blutbank des Bayer. Roten Kreuzes, München)
Heparin, 5000 E/ml
(Apotheke der klin. Universitätsanstalten München)
Dextran, 200.000 - 300.000 MG
(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)
6-3H-Thymidin, spezifische Aktivität 5 mCi/mM
(Amersham Buchler, Braunschweig)
Trichloressigsäure 5% (Merck, Darmstadt)
Toluol (Merck, Darmstadt)
2,5-di-Phenyloxazol "PPO"
(Koch-Light-Laboratories Ltd, Coinbrocks,Bucks,England)
Polystyrol-Teströhrchen, 12 x 75 mm
(Falcon Plastics, Oxnard, California)
Linbro-Gewebekulturplatten Nr. FB 96-TC (FLOW, Bonn)
HeLa - Zellen der Linie "S 3" (FLOW, Bonn)
Zellulose-Acetat-Membranfilter Nr. SM 111-06025
(Sartorius, Göttingen)
Filterpapier für Skatron (FLOW, Bonn)
Misch-Antigen-Cocktail (Behringwerke AG, Marburg-Lahn)

2.1.2. Zubereitung bestimmter Präparate

Antigen-Gemisch:

Als Antigene wurden verwendet:
Tuberkulin GT, Stärke: 1000 I.E.
(10 µg Substanz gelöst in 1,7 ml Aqua dest. und mit Medium 1 : 10 verdünnt).

Tetanus Toxoid, Acerbat 75 I.E.
(mit 0,025 Natriumtinnafonat und 1,5 mg Aluminiumhydroxid 1 : 500 verdünnt).

Mumps-Antigen: Atenuiertes Mumpsvirus, Stamm Jeryl-Lynn, 5000 $GKID_{50}$ (mit ca. 0,3 mg Humanalbumin und max. 30 µg Neomycinsulfat).

Vaccinia-Antigen, $10^6$ $GKID_{50}$ (mit Aluminiumhydroxid, 1 : 20 verdünnt).

Streptolysin 0, 750 000 I.E.

Das Gemisch der Präparate in den angegebenen Verdünnungen bzw. Mengen wurde als Lyophilisat aufbewahrt. Die Konzentration der Einzelkomponenten im Gemisch beruhte auf Untersuchungen von Prof. Dr. R. Johannsen, der für jede Einzelkomponente optimal stimuliertende Dosen bei gesunden Probanden ermittelt hatte.

Wir verwendeten in unseren Versuchen "Kulturmedium 1640" aus Medium RPMI 1640, angereichert mit Humanserum (10 %), Glutamin (0,04 mMol/ml), Penicillin G (100 E/ml) und Streptomycin (100 µg/ml), wurde für Leukozytenkulturen verwendet.

"Kulturmedium MEM" aus Minimum Essential Medium, angereichert mit fetalem Kälberserum ( 10 % ), Penicillin G ( 100 E/ml ) und Streptomycin ( 100 µg/ml ) wurde für Indikatorzellkulturen verwendet.

Dextran wurde mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer 6 %igen Lösung bereitet.

6-3H-Thymidin wurde 1 : 10 mit destilliertem Wasser verdünnt und bei 4 $^{\circ}$ C aufbewahrt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Präparation nochmals 1 : 10 verdünnt, und zwar mit Kulturmedium 1640 (für Leukozytenkulturen) oder mit Kulturmedium MEM (für Indikatorzellkulturen).

Der Szintillator wurde aus Toluol unter Zugabe von PPO ( 5 g/l ) hergestellt.

2.1.3 Geräte

Alle Inkubationen wurden durchgeführt bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% $CO_2$ und 95% Luft in einem Inkubator der Firma Heraeus, Typ KD 600 K $CO_2$.

Die Präparation der radioaktiv markierten DNS von Leukozyten/Lymphoblasten auf Zellulose-Acetat-Membranfilter geschah mit Hilfe eines Vielfachfiltriergerätes der Firma Hölzel, München.
Die radioaktiv markierte DNS der Indikatorzellen wurde mit Hilfe eines "multiple cell-culture harvester" (Skatron AS, Heggtopen, Lierbyen, Norwegen) auf Filterpapier übertragen.

Die Szintillationsspektrometrie wurde mittels eines Flüssigkeits-Szintillations-Zählers der Firma Packard (Modell B 2450) durchgeführt. Dabei wurden die Filterplättchen (mit der präzipitierten, radioaktiv markierten DNS der Lymphozyten, bzw. der Indikatorzellen) zusammen mit 10 ml des Szintillators in Szintillationsröhrchen gefüllt, und die counts pro Minute (cpm) gemessen.

## 2.2 Methodik

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden beruhen im wesentlichen auf den von EIFE und Mitarbeitern veröffentlichten Angaben (EIFE und AUGUST, 1973; EIFE et al., 1974).
Das Prinzip der Methode besteht darin, daß Lymphozyten in Suspension stimuliert werden und von den auf die Stimulation hin erfolgten Reaktionen gemessen werden:
1. die induzierte Lymphozyten-Blastentransformation
2. die Lymphotoxin-Bildung
Außerdem wurde die spontane Zellproliferation in den nichtstimulierten Lymphozytenkulturen bestimmt.

### 2.2.1 Patienten und Kontrollpersonen

Es wurden klinisch gesunde Personen (Erwachsene, n=126, Kinder, n=24) und Patienten mit bestimmten immunologischen und nicht immunologischen Erkrankungen (Kinder, n=112) untersucht. Ein Teil der Probanden wurde wiederholt untersucht.

2.2.2 Lymphozyten-Stimulation

Venöses Blut von Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurde heparinisiert (0,02 ml Heparin/ml), zur beschleunigten Trennung der Erythrozyten von den Leukozyten mit 6%igem Dextran (1 Teil Dextran auf 4 Teile Blut) gemischt und dann bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Sedimentation der Erythrozyten wurde das Plasma mit den Leukozyten abgehoben und bei 100 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Leukozyten-freie Plasma/Dextran-Gemisch wurde verworfen und die im Bodensatz befindlichen Zellen in Medium RPMI 1640 suspendiert, bei 40 g zentrifugiert und je nach Ausgangsvolumen des Blutes in 2-5 ml Medium RPMI 1640 resuspendiert. Die Zellen wurden dann gezählt und nach mono- und polynukleären Zellen differenziert.
Durch Zugabe von Kulturmedium 1640 wurde eine Zellsuspension mit $1{,}3 \times 10^5$ mononukleären Zellen (Lymphozyten) pro ml hergestellt und je 1,5 ml dieser Zellsuspension in 12 x 75 mm Kulturröhrchen gegeben. Die so hergestellten Leukozytenkulturen enthielten dann 200.000 Lymphozyten mit einem - je nach Differentialblutbild des Patienten zur Zeit der Blutabnahme - variablen Anteil von Granulozyten.
Die Stimulation der Lymphozyten erfolgte durch Zugabe des Antigen-Gemisches (Beschreibung siehe Kap. 2.1.2. -Zubereitung bestimmter Präparate) zu den Kulturen. Kontrollkulturen enthielten die gleiche Menge Medium RPMI 1640. Für jede Antigenkonzentration wurden ein bis zwei identische Kulturen angesetzt. Die Teströhrchen wurden locker verschlossen und aufrechtstehend für 7 Tage inkubiert.

2.2.3 Blastentransformation

Nach der Inkubation wurden die Leukozyten-Kulturen bei 40 g für 10 Minuten zentrifugiert und je 1,0 ml des zellfreien Mediums abgehoben. Die Überstände von identischen Kulturen wurden gepoolt und bis zur Bestimmung des Lymphotoxin-Gehaltes (s. 2.2.4) bei -18°C eingefroren. Den Rest-Kulturen wurde je 1,0 µCi 3H-Thymidin zugegeben und die Zellen für weitere drei Stunden inkubiert. Die Inkorporation des 3H-Thymidins in die DNS der Zellen wurde durch Abkühlen der Kulturen auf 0°C (im Eisbad) gestoppt und die Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung auf Zellulose-Acetat-Membranfilter gewaschen. Die Filter wurden mit Trichloressigsäure und Äthylalkohol gespült, getrocknet und ihre Radioaktivität mittels Szintillationsspektrometrie gemessen.

Die Spontanproliferation in nicht-stimulierten Kulturen wurde nach dem gleichen Verfahren bestimmt.

### 2.2.4 Lymphotoxin-Nachweis

Als Indikatorzellen für den Nachweis von Lymphotoxin wurden HeLa-Zellen der Linie "S 3" (FLOW, Bonn) benutzt. Die Zellen wurden als Vorratskulturen in 500 ml Flaschen in Kulturmedium MEM als Monolayer-Kulturen gezüchtet und zweimal wöchentlich rekultiviert. Zur Anzüchtung von Indikatorzell-Kulturen wurden aus den Vorratskulturen durch Trypsinieren und kräftigem Pipettieren Einzelzell-Suspensionen hergestellt.

Auf Linbro-Gewebe-Kultur-Platten wurden 100 µl-Kulturen mit $1 \times 10^4$ Zellen angesetzt, für 24 Stunden vorinkubiert und dann mit 50 µl der zellfreien Medien der Leukozyten-Kulturen (s. 2.2.3) beschickt. Nach einer Inkubation von 45 Stunden wurden den Kulturen je 0,5 µCi 3H-Thymidin (in 50 µl Kulturmedium MEM) zugegeben und die Inkubation für weitere drei Stunden fortgesetzt.

Zur Beendigung der Inkubation wurde das Medium von den Kulturen abgegossen und zum Ablösen der Zellen den Kulturen je 200 µl Trypsin zugegeben. Die Zellen wurden anschließend mittels eines "multiple cell-culture harvester" (SKATRON AS, Heggtopen) mit physiologischer Kochsalz-Lösung auf Filterpapier gewaschen.

Die nach dem Waschen auf den Filtern verbleibende Radioaktivität (3H-Thymidin) wurde mittels Szintillationsspektrometrie bestimmt.

### 2.2.5 Auswertung der Ergebnisse

Definition des Stimulationsindex:

Der Stimulationsindex ist definiert als der Quotient aus den cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in stimulierten Kulturen (mit Antigen) und den cpm in nicht stimulierten Kulturen (ohne Antigen):

$$SI = \frac{\text{cpm 3H-Thymidin-Einbau (Kulturen mit Antigen)}}{\text{cpm 3H-Thymidin-Einbau (Kulturen ohne Antigen)}}$$

Definition der Stimulationsdifferenz:

Die Stimulationsdifferenz ist definiert als die Differenz zwischen den cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Kulturen mit Antigen (stimulierten Kulturen) und den cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Kulturen ohne Antigen (Kontroll-Kulturen).

Definition der Lymphotoxinaktivität:

Die Lymphotoxin-Sekretion in stimulierten Lymphozyten-Kulturen wurde bestimmt im DNS-Synthese-Hemmtest mit HeLa-Zellen als Indikatorzellen. Aus den counts pro Minute (cpm) in Indikatorzell-Kulturen mit lymphotoxin-haltigem Medium ($cpm_{LT}$) und denen in Kulturen ohne Lymphotoxin (Kontrollen = $cpm_K$) wird die Aktivität des Toxins berechnet und in Prozent Hemmung angegeben:

$$\frac{cpm_K - cpm_{LT}}{cpm_K} \times 100 = \text{Hemmung (in \%)}$$

## 3. AUSWERTUNG DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

### 3.1. Vorversuche: Kinetik- und Dosis-Wirkungs-Untersuchungen

#### 3.1.1. Antigen-Gemisch I

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen und zur Ermittlung optimaler Kulturbedingungen für die Stimulation mit dem Antigen-Gemisch wurden Lymphozyten eines gesunden Probanden (TA) mit steigenden Antigen-Dosen (Charge I) stimuliert und nach 5, 6 und 7-tägiger Inkubation die Lymphoproliferation und die Lymphotoxin-Sekretion gemessen.

Lymphoproliferation (Tab. 1 + Abb. 1)

Mit Ausnahme höchster Antigen-Dosen (Verdünnungen 1:1 - 1:27) induzierten alle verwendeten Antigen-Dosen eine DNS-Synthese in den Lymphozyten-Kulturen. Werte über 1000 cpm wurden mit den Antigen-Verdünnungen 1:81 bis 1:2167 erreicht.
Für alle stimulierenden Antigen-Dosen ließ sich vom 5. Tag bis zum 7. Tag der Inkubation eine kontinuierliche Steigerung der DNS-Synthese feststellen. Das Maximum der DNS-Synthese wurde jeweils mit der Antigen-Verdünnung 1:243 erreicht.

Bemerkenswert ist, daß es nach Zugabe der höchsten Antigen-Konzentrationen (Verdünnung 1:1 - 1:27) zu einer deutlichen Abnahme der spontanen DNS-Synthese in den Kulturen kam.
In einzelnen Ansätzen betrug die Abnahme über 90 %, sodaß man eine toxische Komponente im Antigengemisch vermuten konnte.

Lymphotoxin-Sekretion

Lymphotoxin ließ sich nur in Lymphozyten-Kulturen nachweisen, die mit der Antigen-Verdünnung 1:81 stimuliert worden waren (Abnahme der cpm von 11.801 (Kontroll-Kultur) auf 6.497 cpm).

Tab. 3.1.1.

Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung gesunder Probanden
(Antigen-Charge I)

| Versuchs-person | Antigen-verdünnung | Lymphoproliferation[1] 5. Tag | 6. Tag | 7. Tag | Lymphotoxin-Bildung Hemmaktivität in % | | Medium-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | [2] | [3] | |
| TA | 1/1 | 47 | 84 | 58 | 0 | (5638) | 4928 |
| | 1/3 | 35 | 34 | 165 | 0 | (12210) | 8787 |
| | 1/9 | 30 | 42 | 26 | 0 | (12349) | 9740 |
| | 1/27 | 54 | 37 | 48 | 0 | (10752) | 10959 |
| | 1/81 | 1786 | 2827 | 4062 | 45 | (6497) | 11394 |
| | 1/243 | 2262 | 4636 | 12865 | 2 | (9128) | 9314 |
| | 1/729 | 1399 | 1563 | 3000 | 0 | (15118) | 10494 |
| | 1/2167 | 1201 | 956 | 1904 | 0 | (11393) | 9217 |
| | 1/6561 | 889 | 1362 | 871 | 0 | (13681) | 10635 |
| | kein Antigen | 465 | 564 | 699 | | (11801) | 11740 |

[1] cpm 3H-Thymidin-Aufnahme je Lymphozytenkultur (Einzelwerte)

[2] Abnahme der cpm (in Prozent) bezogen auf die cpm der Kontrollkultur (Medium von Kulturen ohne Antigen-Stimulation

[3] cpm 3H-Thymidin-Aufnahme je Indikator-Zellkultur (Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die max. Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert betrug weniger als 20 %)

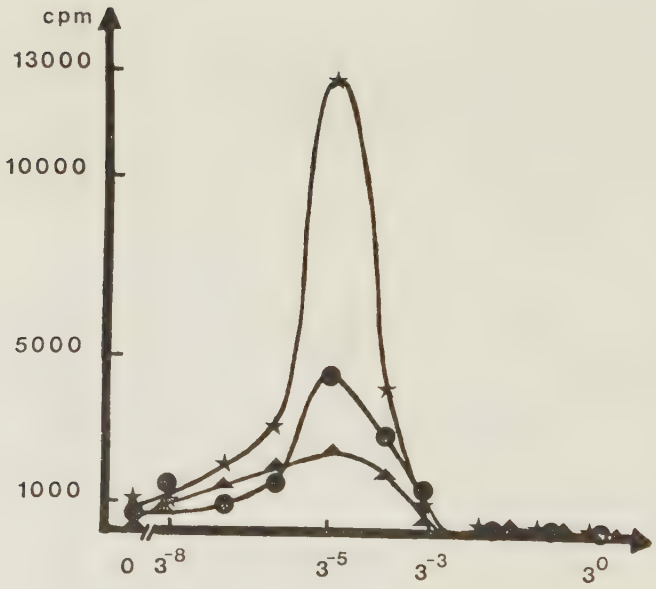


Abb. 1: Antigen-induzierte Lymphoproliferation bei einem gesunden Probanden nach 5 (Δ), 6 (O) und 7 (*) -tägiger Inkubation.

Ordinate: Stimulationsdifferenz (cpm)
Abszisse: Stimulationsindex

Tab. 3.1.2.

Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung gesunder Probanden (Antigen-Charge I)

| Versuchsperson | Antigenverdünnung | Lymphoproliferation[1] | Lymphotoxin-Bildung Hemmaktivität in % | |
|---|---|---|---|---|
| | | | [2] | [3] |
| EI | 1/1 | 159 | 0 | (8797) |
| | 1/2 | 4205 | 0 | (8896) |
| | 1/4 | 40595 | 25 | (6229) |
| | 1/8 | 34247 | 47 | (5259) |
| | 1/16 | 31124 | 47 | (5274) |
| | 1/32 | 23731 | 25 | (6245) |
| | 1/64 | 16487 | - | - |
| | 1/128 | 10576 | 13 | (7190) |
| | 1/250 | 3916 | 5 | (7880) |
| | 1/500 | 784 | 0 | (8604) |
| | 1/1000 | 231 | 0 | (9323) |
| | 1/2000 | 772 | 5 | (7839) |
| | kein Antigen | 827 | – | (8251) |
| LE | 1/1 | 44 | 0 | (7817) |
| | 1/2 | 47 | 3 | (7294) |
| | 1/4 | 9401 | 10 | (6770) |
| | 1/8 | 6496 | 4 | (7234) |
| | 1/16 | 3778 | 0 | (7550) |
| | 1/32 | 2500 | 0 | (7894) |
| | 1/64 | 1051 | 0 | (8159) |
| | 1/128 | 771 | 0 | (7629) |
| | 1/250 | 866 | 0 | (7474) |
| | 1/500 | 797 | 4 | (7209) |
| | 1/1000 | 566 | 0 | (7871) |
| | 1/2000 | 684 | 4 | (7269) |
| | kein Antigen | 549 | – | (7504) |
| TA | 1/1 | | - | |
| | 1/2 | 48 | 4 | (15111) |
| | 1/4 | 25598 | 46 | (8615) |
| | 1/8 | 24699 | 48 | (8230) |
| | 1/16 | 22583 | 44 | (8885) |
| | 1/32 | 13240 | 40 | (9499) |
| | 1/64 | 15927 | 25 | (11750) |
| | 1/128 | 8533 | 19 | (12818) |
| | 1/250 | 5840 | 12 | (13797) |
| | 1/500 | 3877 | 17 | (13013) |
| | 1/1000 | 1646 | 7 | (14671) |
| | 1/2000 | 775 | 5 | (14946) |
| | kein Antigen | 477 | - | (15735) |

Legende: Siehe Tab. 3.1.1.

Diese Untersuchung wurde 18 Monate nach der vorangehenden (Tab. 3.1.1.) durchgeführt.

Diese toxische Aktivität war, wie die Indikator-Zellen mit Kontrollmedium zeigten, nicht auf das Antigen selbst zurückzuführen. Das Antigen-Gemisch war gegenüber den Indikator-Zellen nur in der höchsten Konzentration toxisch.

Diese erste Dosis-Wirkungs-Studie ergab also, daß das Antigen-Gemisch Lymphozyten in einem weiten Bereich (1:81 - 1:2167) zur Blastentransformation stimuliert, in einem engen Bereich (1:81) eine Lymphotoxin-Bildung induziert und toxisch gegen Lymphozyten (1:1 - 1:27) und HeLa-Zellen (1:1) wirkt.

Bei der Wiederholung der Untersuchungen (Tab. 3.1.2.) nach 18 Monaten wurden Lymphozyten von drei gesunden Probanden stimuliert.

Lymphoproliferation

Im Gegensatz zur ersten Untersuchung induzierten in diesen Untersuchungen auch höhere Dosen (ab Verdünnung 1:4 bei zwei und 1:2 bei einem Probanden) eine meßbare DNS-Synthese. Die toxische Wirkung der Antigen-Charge I auf Lymphozyten zeigte sich jetzt nur noch in höchsten Konzentrationen (Verdünnung 1:1 und 1:2).
Für alle drei Probanden lag die maximal stimulierende Dosis bei einer Verdünnung von 1:4, d.h. unmittelbar neben der toxischen Dosis.

Lymphotoxin-Sekretion

Im Gegensatz zur ersten Untersuchung ließ sich Lymphotoxin bei der Wiederholungsuntersuchung (Tab. 3.1.2.) in Kulturen von zwei der drei Probanden in einem breiteren Dosis-Bereich induzieren (Verdünnungen 1:4 - 1:500 bzw. 1 : 4 - 1 : 32). Hohe Antigen-Konzentrationen induzierten weder eine Lymphotoxin-Sekretion, noch waren sie selbst, wie im ersten Versuch, toxisch gegenüber den HeLa-Zellen.

Einer der Probanden ließ sich zu keiner meßbaren Lymphotoxin-Sekretion stimulieren; bei diesem Probanden war auch die Lymphoproliferation nur schwach meßbar.

Die Antigen-Charge I enthielt nach diesen Untersuchungen eine oder mehrere toxische Komponenten, deren Aktivität nach 18-monatiger Lagerung abnahm (vgl. Tab. 3.1.1. und 3.1.2.), in höchsten Konzentrationen jedoch nachweisbar blieb.

Wir haben daraufhin die Wirkung von zwei weiteren Antigen-Chargen auf die Induktion von Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Sekretion, sowie auf Toxizität gegenüber Leukozyten und HeLa-Zellen untersucht.

### 3.1.2. Antigen-Gemisch II

Entsprechend der Dosis-Wirkungs-Untersuchung mit der Antigen-Charge I wurden in diesem Teil der Studie die Lymphoproliferation (am 7. Inkubationstag) und die Lymphotoxin-Sekretion von Lymphozyten dreier gesunder Probanden nach Stimulation mit der Antigen-Charge II bestimmt (Tab. 3.1.3.); zusätzlich wurden mit der optimalen Antigen-Dosis die Lymphozyten-Funktionen von 18 Personen (11 Gesunde und 7 Patienten) untersucht (Tab. 3.1.4.).

#### Lymphoproliferation

Die Lymphozyten aller drei Probanden ließen sich durch das Antigen-Gemisch zur Lymphoproliferation stimulieren, jedoch war die Stärke der Reaktion deutlich unterschiedlich:
Bei dem Probanden TA induzierten alle Antigen-Dosen (1:2000 - 1:1) eine DNS-Synthese über 1000 cpm und die Antigen-Verdünnungen 1:128 - 1:1 eine DNS-Synthese von mehr als 10.000 cpm 3H-TdR-Aufnahme/Kultur.

Tab. 3.1.3.
Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung gesunder Probanden (Antigen-Charge II)

| Versuchsperson | Antigenverdünnung | Lymphoproliferation[1] | Lymphotoxin-Bildung Hemmaktivität in % | |
|---|---|---|---|---|
| TA | 1/1 | 23224 | 47[2] | (8294)[3] |
| | 1/2 | 38066 | 53 | (7326) |
| | 1/4 | 42634 | 47 | (8288) |
| | 1/8 | 49695 | 51 | (7638) |
| | 1/16 | 33322 | 39 | (9565) |
| | 1/32 | 21416 | 45 | (8647) |
| | 1/64 | 15465 | 27 | (11419) |
| | 1/128 | 11303 | 23 | (12124) |
| | 1/250 | 4857 | 10 | (14201) |
| | 1/500 | 2927 | 0 | (16481) |
| | 1/1000 | 1627 | 2 | (15467) |
| | 1/2000 | 1037 | 12 | (13771) |
| | kein Antigen | 477 | - | (15735) |
| EI | 1/1 | 44821 | 51 | (4012) |
| | 1/2 | 38332 | 32 | (5632) |
| | 1/4 | 39423 | 34 | (5462) |
| | 1/8 | 29344 | 29 | (5863) |
| | 1/16 | 12394 | 22 | (6397) |
| | 1/32 | 12258 | 4 | (7913) |
| | 1/64 | 4330 | 1 | (8162) |
| | 1/128 | 1803 | 1 | (8184) |
| | 1/250 | 921 | 8 | (7632) |
| | 1/500 | 853 | 0 | (8461) |
| | 1/1000 | 1057 | 0 | (8301) |
| | 1/2000 | 731 | 1 | (8178) |
| | kein Antigen | 827 | - | (8251) |
| LE | 1/1 | 21985 | 24 | (5735) |
| | 1/2 | 20708 | 24 | (5689) |
| | 1/4 | 14622 | 14 | (6459) |
| | 1/8 | 8528 | 0 | (7711) |
| | 1/16 | 4056 | 0 | (7516) |
| | 1/32 | 1600 | 0 | (7500) |
| | 1/64 | 1008 | 0 | (8212) |
| | 1/128 | 766 | 0 | (7772) |
| | 1/250 | 1070 | 0 | (7767) |
| | 1/500 | 584 | 0 | (7658) |
| | 1/1000 | 714 | 0 | (8376) |
| | 1/2000 | 608 | 0 | (8871) |
| | kein Antigen | 549 | - | (7504) |

Legende: Siehe Tab. 3.1.1

Die Lymphozyten des Probanden EI ließen sich erst mit höheren Antigen-Dosen (Verdünnung 1:250 - 1:1) zu einer DNS-Synthese über 1000 cpm und mit den Antigen-Verdünnungen (1:32 - 1:1) über 10.000 cpm stimulieren.
Am schwächsten reagierten die Lymphozyten des Probanden LE. Für eine DNS-Synthese von über 1000 cpm waren Verdünnungen von 1:250 - 1:1 und für eine solche von über 10.000 cpm Verdünnungen von 1:4 - 1:1 notwendig.

Lymphotoxin-Sekretion

Eine Lymphotoxin-Sekretion ließ sich im Gegensatz zur DNS-Synthese nur nach Stimulation mit höheren Antigen-Dosen nachweisen.

Die Lymphozyten des Probanden TA wurden mit Antigen-Dosen von 1:128 - 1:1, die des Probanden EI mit Dosen von 1:16 - 1:1, und die des Probanden LE erst mit Antigen-Dosen von 1:4 - 1:1 zu einer meßbaren Lymphotoxin-Sekretion stimuliert.
Für die einzelnen Probanden bestand eine enge Korrelation zwar zwischen DNS-Synthese und Lymphotoxin-Sekretion: erst wenn die DNS-Synthese etwa 10.000 cpm betrug, ließ sich Lymphotoxin nachweisen; für die 3 Probanden untereinander bestand die Korrelation zwischen der Stärke der Lymphoproliferation und der Lymphotoxinbildung jedoch nicht.

Die Antigen-Charge II enthielt nach diesen Untersuchungen keine toxische Komponente gegen Lymphozyten.
Für die folgenden Untersuchungen mit der Antigen-Charge II wählten wir zur Induktion von Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Sekretion das unverdünnte Antigen (maximal stimulierende Dosis für 2 der 3 Probanden).

Tab. 3.1.4.

Diagnosen der mit Antigen-Charge II untersuchten Probanden

| Diagnosen | Anzahl |
|---|---|
| gesunde Kontrollpersonen | 11 |
| akute lymphatische Leukämie (ALL) | 2 |
| Hypo-Gamma-Globulinämie | 2 |
| Wilmstumor | 1 |
| chron. Nasennebenhöhleninfekte | 1 |
| schwerer kombinierter Immundefekt (SCID) | 1 |
| Gesamtzahl | 18 |

Lymphoproliferation mit Antigen-Charge II bei 18 Probanden

Von den 18 hier untersuchten Personen waren 11 gesunde Probanden, 2 Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL), 2 Patienten mit Hypo-Gamma-Globulinämie, 1 Patient mit Wilms'-Tumor, 1 Patient mit chronischen Nasennebenhöhleninfekten, sowie 1 Patient mit einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID), (Tab. 3.1.4.).

Wir haben die Untersuchungsergebnisse (Tab. 3.1.5.) unter Berücksichtigung von Stimulationsindex und Stimulationsdifferenz bewertet. Einen Stimulationsindex über 10 und eine Stimulationsdifferenz über 10.000 cpm fanden wir bei 13 der 18 Probanden. In dieser Gruppe waren die 11 gesunden Kontrollpersonen, ein 2-jähriger Junge mit einer Hypo-Gamma-Globulinämie und der Patient mit Wilms'-Tumor.
Einen Stimulationsindex über 10 oder eine Stimulationsdifferenz über 10.000 cpm fanden wir bei 16 der 18 Probanden. In dieser Gruppe fand sich neben den vorgenannten das zweite Kind mit der Hypo-Gamma-Globulinämie, der Patient mit chronischen Nasennebenhöhleninfektionen und einer der Patienten mit ALL. 2 der 18 Probanden reagierten mit einem Stimulationsindex unter 10 und einer Stimulationsdifferenz unter 10.000 cpm: der zweite Patient mit ALL (Stimulationsindex 9,2/Stimulationsdifferenz 1367) und der Patient mit der schweren kombinierten Immuninsuffizienz (Stimulationsindex 1/Stimulationsdifferenz 0).

Wegen der hohen Dosis (schneller Verbrauch) konnten wir diese Antigen-Charge nicht länger verwenden. Die Ergebnisse zeigten jedoch, daß grundsätzlich Serien-Untersuchungen mit dem Misch-Antigen möglich sind und daß Immunstörungen (bei primär schwerer kombinierten Immundefizienzen aber auch bei sekundärer Immundefizienz bei akuter lymphoblastischer Leukämie) zu einer Störung der Antigen-induzierten Lymphoproliferation führen können.

Tab. 3.1.5.

Stimulationsindex (SI) und Stimulationsdifferenz (SD) (gesunde Probanden) Antigen-Charge II

| SD \ SI | 1 | 1-2 | 2-5 | 5-10 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 1 * | | | | |
| 1-500 | | | | | |
| 500-1000 | | | | | |
| 1000-5000 | | | | 1 | 1 |
| 5000-10000 | | | | | 2 |
| 10000 | | | | | 13 |

Definition von Normbereichen siehe Kap. 3.2.6.

* Anzahl der Probanden- von wiederholt untersuchten Probanden wurde nur jeweils die zeitlich erste Untersuchung berücksichtigt.

3.1.3. Antigen-Gemisch III

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehungen und zur Ermittlung optimaler Kultur-Bedingungen für die Antigen-induzierte Lymphozyten-Stimulation wurden Lymphozyten gesunder Probanden (TA und PR) mit steigenden Dosen der Antigen-Charge III stimuliert und nach 7-tägiger Inkubation die DNS-Synthese und die Lymphozyten-Sekretion gemessen.

Lymphoproliferation (Tab. 3.1.6.)

Mit Ausnahme der niedrigsten Antigen-Dosis (Verdünnung 1 : 2000) induzierten alle Antigendosen eine Lymphoproliferation; Werte über 1000 cpm 3H-Thymidin-Aufnahme wurden mit den Antigen-Verdünnungen 1 : 250 bis 1 : 1, Werte über 10.000 cpm wurden mit den Antigen-Verdünnungen 1 : 8 bzw. 1 : 16 bis 1 : 1 erreicht. Das Maximum der Lymphoproliferation wurde bei beiden Probanden mit der Antigen-Verdünnung 1 : 2 induziert.

Lymphotoxin-Sekretion

Im Gegensatz zur Lymphoproliferation ließ sich eine Lymphotoxin-Sekretion nur nach Stimulation mit höheren Antigen-Dosen nachweisen (Verdünnungen 1 : 128 bzw. 1 : 16 bis 1 : 1). Zwischen der Stärke der Lymphoproliferation und der Lymphotoxin-Sekretion besteht keine enge Korrelation.

Da die Antigen-Charge nach längerer Lagerung ihre Aktivität geändert hatte, haben wir die Dosiswirkungsuntersuchungen mit der Antigen-Charge III nach zwei bzw. sechs Monaten wiederholt. Diese Dosis-Wirkungs-Untersuchungen (Tab. 3.1.7. und Tab. 3.1.8.) erbrachten die gleichen Ergebnisse wie die Erstuntersuchung, also keine Änderung der Stimulationskapazität mit längerer Lagerung. Insbesondere war diese Antigen-Charge zu keinem Zeitpunkt toxisch. Auch hier bestand zwischen der Stärke der Lymphoproliferation und der der Lymphotoxinbildung für die beiden Probanden untereinander keine Korrelation.

Tab. 3.1.6.

Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung gesunder Probanden (Antigen-Charge III)

| Versuchsperson | Antigenverdünnung | Lymphoproliferation[1] | Lymphotoxin-Bildung Hemmaktivität in % | |
|---|---|---|---|---|
| TA | 1/1 | 24638 | 60[2] | (2774)[3] |
| | 1/2 | 26225 | 66 | (2358) |
| | 1/4 | 17345 | 61 | (2655) |
| | 1/8 | 15366 | 62 | (2610) |
| | 1/16 | 14722 | 50 | (3446) |
| | 1/32 | 8503 | 46 | (3711) |
| | 1/64 | 7375 | 41 | (4806) |
| | 1/128 | 2845 | 17 | (5749) |
| | 1/250 | 1953 | 7 | (6413) |
| | 1/500 | 381 | 0 | (7616) |
| | 1/1000 | 326 | 0 | (8089) |
| | 1/2000 | 216 | 6 | (6464) |
| | kein Antigen | 224 | - | (6891) |
| PR | 1/1 | 23251 | 22 | (5681) |
| | 1/2 | 32057 | 16 | (6037) |
| | 1/4 | 22761 | 19 | (5931) |
| | 1/8 | 12051 | 23 | (5674) |
| | 1/16 | 7780 | 27 | (5345) |
| | 1/32 | 6318 | 0 | (7399) |
| | 1/64 | 4319 | 0 | (7526) |
| | 1/128 | 3984 | 0 | (9528) |
| | 1/250 | 2174 | 0 | (10026) |
| | 1/500 | 819 | 0 | (10839) |
| | 1/1000 | 334 | 0 | (9879) |
| | 1/2000 | 147 | 0 | (11992) |
| | kein Antigen | 173 | - | (7283) |

Legende: Siehe Tab. 3.1.1.

Tab. 3.1.7.

Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung gesunder Probanden (Antigen-Charge III)

| Versuchsperson | Antigenverdünnung | Lymphoproliferation[1] | Lymphotoxin-Bildung Hemmaktivität in % | |
|---|---|---|---|---|
| TA | 1/4 | - | -[2] | -[3] |
| | 1/8 | 11341 | 46 | (1970) |
| | 1/16 | 10341 | 43 | (2095) |
| | 1/32 | 6556 | 42 | (2118) |
| | 1/64 | 3822 | 2 | (3591) |
| | 1/128 | 1739 | 0 | (3897) |
| | 1/250 | 1990 | 0 | (4095) |
| | 1/500 | 1816 | 12 | (3213) |
| | 1/1000 | 1609 | 0 | (3772) |
| | 1/2000 | 1931 | 15 | (3106) |
| | kein Antigen | 1157 | - | (3643) |
| PR | 1/4 | - | - | - |
| | 1/8 | 25690 | 75 | (1332) |
| | 1/16 | 24813 | 74 | (1393) |
| | 1/32 | 27277 | 74 | (1379) |
| | 1/64 | 32648 | 67 | (1737) |
| | 1/128 | 31666 | 40 | (3209) |
| | 1/250 | 14042 | 45 | (2919) |
| | 1/500 | 12147 | 29 | (3755) |
| | 1/1000 | 2898 | 11 | (4723) |
| | 1/2000 | 1798 | 5 | (5667) |
| | kein Antigen | 168 | - | (5993) |

Legende: Siehe Tab. 3.1.1.

Die Untersuchung wurde 2 Monate nach der vorangehenden (Tab. 3.1.6.) durchgeführt.

Tab. 3.1.8.

Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung gesunder Probanden (Antigen-Charge III)

| Versuchsperson | Antigenverdünnung | Lymphoproliferation[1] | Lymphotoxin-Bildung Hemmaktivität in % | |
|---|---|---|---|---|
| TA | 1/2 | 16046 | 81[2] | (1168)[3] |
| | 1/4 | 17752 | 77 | (1453) |
| | 1/8 | 29827 | 81 | (1193) |
| | 1/16 | 25796 | 79 | (1289) |
| | 1/32 | 16806 | 75 | (1581) |
| | 1/64 | 17676 | 73 | (1664) |
| | 1/128 | 7518 | 50 | (3100) |
| | 1/250 | 4166 | 27 | (4545) |
| | 1/500 | 3197 | 12 | (5483) |
| | kein Antigen | 886 | - | (6187) |
| PR | 1/2 | 22252 | 87 | (789) |
| | 1/4 | 17413 | 82 | (1105) |
| | 1/8 | 13525 | 78 | (1367) |
| | 1/16 | 11146 | 78 | (1360) |
| | 1/32 | 9143 | 75 | (1540) |
| | 1/64 | 7746 | 68 | (1980) |
| | 1/128 | 6278 | 54 | (2854) |
| | 1/250 | 3305 | 44 | (3457) |
| | 1/500 | 2817 | 31 | (4274) |
| | kein Antigen | 155 | - | (6192) |
| LE | 1/2 | 20582 | 82 | (1261) |
| | 1/4 | 27623 | 78 | (1505) |
| | 1/8 | 24166 | 76 | (1624) |
| | 1/16 | 19994 | 73 | (1854) |
| | 1/32 | 15120 | 70 | (2041) |
| | 1/64 | 6595 | 54 | (3171) |
| | 1/128 | 4700 | 27 | (5012) |
| | 1/250 | 2025 | 28 | (4966) |
| | 1/500 | 1278 | 18 | (5663) |
| | kein Antigen | 199 | - | (6867) |

Legende: Siehe Tab. 3.1.1.

Diese Untersuchung wurde 6 bzw. 4 Monate nach den beiden vorangehenden (Tab. 3.1.6. bzw. 3.1.7.) durchgeführt.

### 3.1.4. Vergleichende Stimulation mit drei der Einzelkomponenten

Um die Stimulationskapazität des Antigen-Gemisches mit der seiner Komponenten zu vergleichen, haben wir die Lymphozyten zweier gesunder Probanden (TA und PR) mit steigenden Dosen von PPD, Tetanus Toxoid und Vaccinia Antigen stimuliert und nach 7-tägiger Inkubation die DNS-Synthese und die Lymphotoxin-Sekretion gemessen. Diese Untersuchungen wurden parallel und als Kontrolle zu den in Tab. 3.1.6. beschrieben durchgeführt.

Lymphoproliferation (Tab. 3.1.9., 3.1.10., 3.1.11.)

Nach Stimulation mit PPD (Tab. 3.1.9.) induzierten beim Probanden TA alle Antigen-Dosen (Verdünnungen 1 : 128 bis 1 : 1) eine Lymphoproliferation; Werte über 1000 cpm 3H-Thymidin-Aufnahme wurden mit den Antigen-Verdünnungen 1 : 32 bis 1 : 1 erreicht. Die stärkste Lymphoproliferation wurde mit der Antigen-Verdünnung 1 : 16 induziert. Beim Probanden PR induzierte lediglich die Antigen-Verdünnung 1 : 2 eine grenzwertige (Def. Kap. 3.2.6.) Lymphoproliferation.

Nach Stimulation mit Tetanus Toxoid (Tab. 3.1.10) induzierten alle Antigen-Dosen (Verdünnungen 1 : 250 bis 1 : 1) eine Lymphoproliferation; Werte über 1000 cpm 3H-Thymidin-Aufnahme wurden mit den Antigen-Verdünnungen 1 : 16 bis 1 : 1 (TA), bzw. 1 : 250 bis 1 : 1 (PR), Werte über 10.000 cpm wurden (nur bei Proband PR) mit den Antigen-Verdünnungen 1 : 128 bis 1 : 1 erreicht. Die stärkste Lymphoproliferation wurde mit den Antigen-Verdünnungen 1 : 8 (TA) bzw. 1 : 16 (PR) induziert.

Nach Stimulation mit Vaccinia Antigen (Tab. 3.1.11.) induzierten beim Probanden TA die Antigen-Verdünnungen 1 : 32 bis 1 : 1 und beim Probanden PR alle Antigendosen (Verdünnungen 1 : 250 bis 1 : 1) eine Lymphoproliferation; Werte über 1000 cpm 3H-Thymidin-Aufnahme wurden mit den Antigen-Verdünnungen 1 : 8 bis 1 : 1 (TA), bzw. 1 : 64 und 1 : 16 bis 1 : 1 (PR), Werte über 10.000 cpm mit den Antigen-Verdünnungen 1 : 2 (TA) und 1 : 1 (PR) erreicht.
Das Mamimum der Lymphoproliferation wurde mit den Antigen-Verdünnungen 1 : 2 (TA) bzw. 1 : 1 (PR) induziert.

Damit lag die maximal induzierbare Lymphoproliferation durch Tuberkulin GT, Tetanus Toxoid und Vaccinia Antigen im gleichen Dosis-Bereich (Verdünnungen 1 : 16 bis 1 : 2) wie beim Antigen-Gemisch III (Tab. 3.1.6.).
Die maximale 3H-Thymidin-Aufnahme lag bei den Komponenten Tuberkulin GT und Vaccinia Antigen durchwegs, bei Tetanus Toxoid lediglich bei einem Probanden (TA) deutlich unter den entsprechenden Werten des Antigen-Gemisches III (Tab. 3.1.6.).
Bei dieser Untersuchung handelte es sich um drei des insgesamt fünf Komponenten enthaltenden Antigen-Gemisches.
Wir erzielten bei den Antigen-Verdünnungen 1 : 128 bis 1 : 1 bei der Summation der Einzelstimulationswerte durchwegs Wertebereiche, die denen des Antigen-Gemisches III entsprachen.
Bei einem Probanden (PR) zeigte sich sogar beim Tetanus Toxoid ein höherer Lymphoproliferationswert in den Verdünnungen 1 : 32 bis 1 : 4 als beim Antigen-Gemisch.
Daraus läßt sich eine teilweise hemmende Komponente einzelner Antigene ableiten.

Lymphotoxin-Sekretion

Ebenso wie beim Antigen-Gemisch III ließ sich eine Lymphotoxin-Sekretion lediglich mit hohen Antigen-Dosen nachweisen

(Tuberkulin GT Verdünnungen 1 : 32 bis 1 : 1 (TA), keine Lymphotoxinbildung (PR); Tetanus Toxoid: Verdünnungen 1 : 8 und 1 : 2 (TA), Verdünnungen 1 : 8 bis 1 : 1 (PR); Vaccinia Antigen: Verdünnungen 1 : 2 und 1 : 1 (TA), Verdünnungen 1 : 32 bis 1 : 2 (PR).
Zwischen der Stärke der Lymphoproliferation und der der Lymphotoxin-Sekretion besteht ebenso wie beim Antigen-Gemisch III für die beiden Probanden untereinander keine enge Korrelation.

Tab. 3.1.9.

Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung gesunder Probanden (Stimulation mit Tuberkulin GT)

| Versuchsperson | Antigenverdünnung | Lymphoproliferation[1] | Lymphotoxin-Bildung Hemmaktivität in % | |
|---|---|---|---|---|
| TA | 1/1 | 494 | 11[2] | (6133)[3] |
| | 1/2 | 4063 | 30 | (4848) |
| | 1/4 | 8667 | 28 | (4963) |
| | 1/8 | 6061 | 15 | (5908) |
| | 1/16 | 9584 | 11 | (6115) |
| | 1/32 | 2701 | 12 | (6094) |
| | 1/64 | 785 | 0 | (7031) |
| | 1/128 | 574 | 0 | (6963) |
| | kein Antigen | 224 | - | (6891) |
| PR | 1/1 | 84 | 0 | (10843) |
| | 1/2 | 245 | 0 | (11378) |
| | 1/4 | 96 | 0 | (10325) |
| | 1/8 | 99 | 0 | (10261) |
| | 1/16 | 73 | 0 | (8408) |
| | 1/32 | 83 | 0 | (11506) |
| | 1/64 | 79 | 0 | (11445) |
| | 1/128 | 113 | 0 | (11497) |
| | kein Antigen | 173 | - | (7283) |

Legende: Siehe Tab. 3.1.1.

Tab. 3.1.10.

Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung gesunder Probanden (Stimulation mit Tetanus)

| Versuchsperson | Antigenverdünnung | Lymphoproliferation[1] | Lymphotoxin-Bildung Hemmaktivität in % | |
|---|---|---|---|---|
| TA | 1/1 | 2527 | 23 [2] | (5301) [3] |
| | 1/2 | 3332 | 2 | (6785) |
| | 1/4 | 6381 | 0 | (7192) |
| | 1/8 | 6383 | 6 | (6488) |
| | 1/16 | 4527 | 2 | (6734) |
| | 1/32 | 625 | 0 | (7287) |
| | 1/64 | 479 | 0 | (7213) |
| | 1/128 | 385 | 0 | (7276) |
| | 1/250 | 328 | 0 | (7776) |
| | kein Antigen | 224 | - | (6891) |
| PR | 1/1 | 11908 | 23 | (5626) |
| | 1/2 | 23603 | 42 | (4197) |
| | 1/4 | 32157 | 53 | (3427) |
| | 1/8 | 33816 | 30 | (5096) |
| | 1/16 | 34487 | 9 | (6649) |
| | 1/32 | 27322 | 4 | (7019) |
| | 1/64 | 21478 | 23 | (5599) |
| | 1/128 | 15389 | 13 | (6359) |
| | 1/250 | 9986 | 10 | (6571) |
| | kein Antigen | 173 | - | (7283) |

Legende: Siehe Tab. 3.1.1.

Tab. 3.1.11.

Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung gesunder Probanden (Stimulation mit Vaccinia)

| Versuchsperson | Antigenverdünnung | Lymphoproliferation[1] | Lymphotoxin-Bildung Hemmaktivität in % | |
|---|---|---|---|---|
| TA | 1/1 | 5661 | 17 [2] | (5712) [3] |
| | 1/2 | 11463 | 14 | (5937) |
| | 1/4 | 4648 | 1 | (6788) |
| | 1/8 | 4994 | 0 | (6890) |
| | 1/16 | 351 | 0 | (7929) |
| | 1/32 | 419 | 0 | (7985) |
| | 1/64 | 162 | 5 | (6570) |
| | 1/128 | 206 | 0 | (7195) |
| | 1/250 | 191 | 0 | (6905) |
| | kein Antigen | 224 | - | (6891) |
| PR | 1/1 | 10709 | 0 | (7808) |
| | 1/2 | 9005 | 6 | (6868) |
| | 1/4 | 5945 | 3 | (7089) |
| | 1/8 | 3202 | 9 | (6611) |
| | 1/16 | 2670 | 0 | (7353) |
| | 1/32 | 603 | 8 | (6706) |
| | 1/64 | 1252 | 0 | (10183) |
| | 1/128 | 585 | 0 | (9369) |
| | 1/250 | 397 | 0 | (8986) |
| | kein Antigen | 173 | - | (7283) |

Legende: Siehe Tab. 3.1.1.

Wahl der Antigen-Dosis für die weiteren Untersuchungen

Eine maximale Lymphoproliferation wurde durch die Antigen-Charge III in den Verdünnungen 1 : 4 bis 1 : 1 (Ausnahme 1 : 64) (Tab. 3.1.6./7. und /8.) induziert.
Für die weiteren Untersuchungen mit einer großen Zahl von Probanden entschlossen wir uns jedoch, um den Verbrauch des Antigen-Gemisches möglichst gering zu halten, mit der Verdünnung 1 : 8 zu arbeiten.
Mit dieser Dosis hatte sich in allen Voruntersuchungen eine Lymphoproliferation von über 10.000 cpm und eine deutlich messbare Lymphotoxinbildung induzieren lassen.

## 3.2. Stimulation von Lymphozyten einer Gruppe gesunder Personen

Als Reaktion auf die Antigen-Stimulation wurden die Lymphoproliferation und die Lymphotoxin-Sekretion bestimmt. Abb. 2 gibt eine Übersicht über die Lymphoproliferation nach Antigen-Stimulation von 126 klinisch gesunden Kontrollpersonen und Tab. 3.2.4 eine Übersicht über die Lymphotoxin-Sekretion der gleichen Probanden.

### 3.2.1. Lymphoproliferation bei gesunden Probanden: Stimulationsindex

Beurteilt man die Lymphoproliferation nur unter Berücksichtigung des Stimulationsindexes, so ergibt sich für die 126 gesunden Kontrollpersonen folgende Verteilung (Abb. 2 und 3 und Tab. 3.2.1): bei 84 % (n=1o6) der Untersuchten liegt der Stimulationsindex über und in 16 % (n=20) unter 10.
Unterteilt man die Gruppe der schwächer reagierenden Versuchspersonen (Stimulationsindex unter 10) in vier weitere Gruppen, so findet man einen Stimulationsindex zwischen 5 und 10 bei 6 % (n=7), einen Stimulationsindex zwischen 2 und 5 bei ebenfalls 6 % (n=7), einen Stimulationsindex zwischen 1 und 2 bei 2 % (n=3) und einen Stimulationsindex unter 1 bei ebenfalls 2 % (n=3) der Untersuchten.

Wenn wir für die Auswertung ausschließlich den Stimulationsindex zugrundelegen und einen "Normalbereich" auf Werte über 10 festlegen, so fallen 84 % (n=106) aller Untersuchungsergebnisse in diesen Bereich, 14 % (n=17) in einen "Grenzbereich" mit Stimulationsindices von 1 bis 10 und 2 % (n=3) in einen "Negativbereich" (keine Lymphoproliferation).

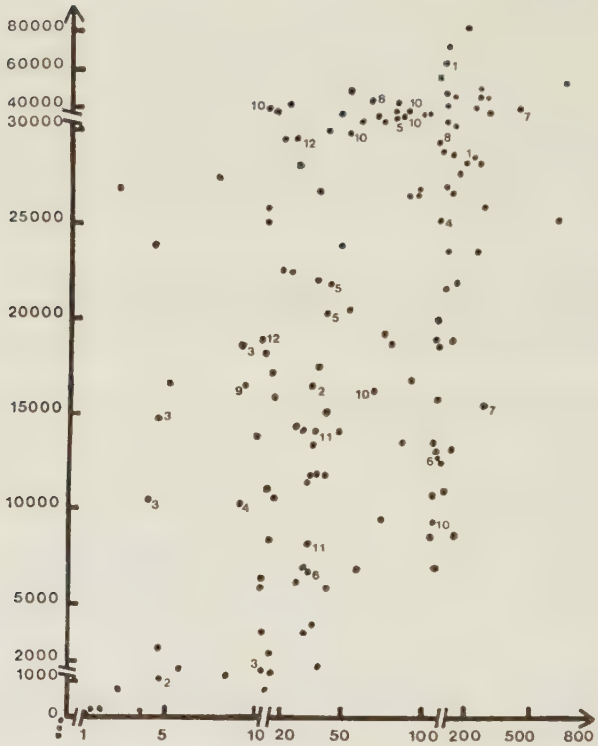


Abb. 2: Antigen-induzierte Lymphoproliferation bei 126 gesunden Probanden: Beziehung zwischen Stimulationsindex (SI) und Stimulationsdifferenz (SD)

Ordinate: Stimulationsdifferenz (cpm)
Abszisse: Stimulationsindex

Die mit Nummern gekennzeichneten Punkte geben Mehrfachbestimmungen einzelner Probanden wieder.

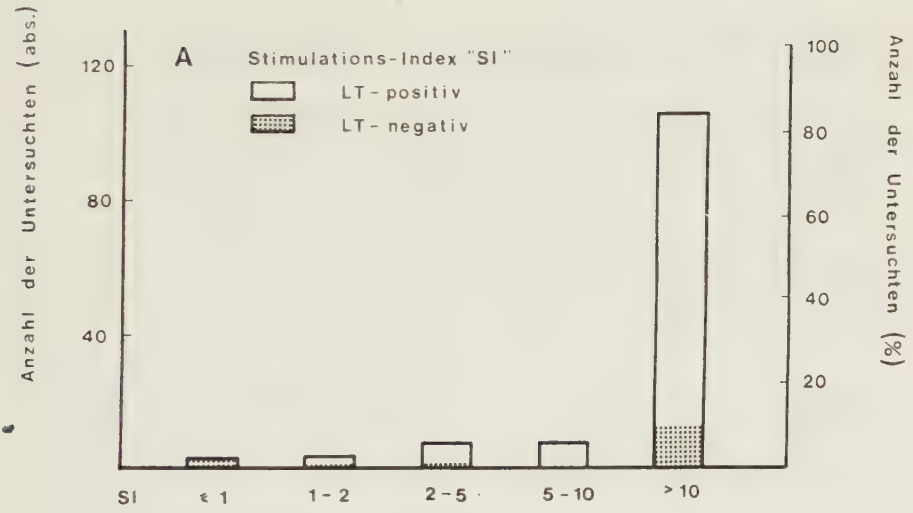


Abb. 3: Antigen-induzierte Lymphoproliferation bei 126 gesunden Probanden: Berechnung des Stimulationsindex (SI)

Ordinate: links: Anzahl der Untersuchten (absolut)
rechts: Anzahl der Untersuchten (in Prozent)
Abszisse: Stimulationsindex (SI) in Bereichen

Gepunkteter Anteil der Säulen: Anzahl der Untersuchten ohne Lymphotoxin-Bildung.

Tab. 3.2.1.

Stimulationsindex (gesunde Probanden)

| Stimulations-index | | Zahl der Personen * | % | Zahl der Untersuchungen ** | % |
|---|---|---|---|---|---|
| Negativ-bereich | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| Grenz-bereich | 1 - 2 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| | 2 - 5 | 7 | 6 | 8 | 6 |
| | 5 -10 | 7 | 6 | 8 | 6 |
| Normal-bereich | 10 | 106 | 84 | 122 | 84 |
| Gesamt | | 126 | 100 | 144 | 100 |

* von wiederholt untersuchten Probanden wurde nur jeweils die zeitlich erste Untersuchung berücksichtigt

** von wiederholt untersuchten Probanden wurden alle Untersuchunen berücksichtigt

### 3.2.2. Lymphoproliferation bei gesunden Probanden: Stimulationsdifferenz

Beurteilt man die Lymphoproliferation nur unter Berücksichtigung der Stimulationsdifferenz, so ergibt sich für die 126 gesunden Kontrollpersonen folgende Verteilung (Abb. 4 und Tab. 3.2.2.):
Bei 73 % (n=92) der Untersuchten liegt die Stimulationsdifferenz über und bei 27 % (n=34) unter 10.000 cpm. Unterteilt man die Gruppe der schwächer reagierenden Kontrollpersonen (27 %) weiter, so ergibt sich
bei 11 % (n=14) eine Stimulationsdifferenz zwischen 5.000 und 10.000 cpm,
bei 9 % (n=11) eine Stimulationsdifferenz zwischen 1.000 und 5.000 cpm,
bei 1,5 % (n=2) eine Stimulationsdifferenz zwischen 500 und 1.000 cpm,
bei 3 % (n=4) eine Stimulationsdifferenz zwischen 1 und 500 cpm und
bei 2,5 % (n=3) der Untersuchten eine Stimulationsdifferenz von 0.

Wenn wir für die Stimulationsdifferenz ähnlich wie für den Stimulationsindex drei Bereiche (Normalbereich mit Stimulationsdifferenz über 10.000 cpm, Grenzbereich mit Stimulationsdifferenz zwischen 1 und 10.000 cpm, Negativbereich mit Stimulationsdifferenz unter 1) angeben , so liegen im Normalbereich 73 %, im Grenzbereich 24,5 % und im Negativ-Bereich 2,5 % der Untersuchten.

Tab. 3.2.2

Stimulationsdifferenz (gesunde Probanden)

| Stimulations-Differenz | | Zahl der Personen* | % | Zahl der Untersuch-ungen** | % |
|---|---|---|---|---|---|
| Negativ-bereich | 0 | 3 | 2,5 | 3 | 2 |
| Grenz-bereich | 1-500 | 4 | 3 | 4 | 2 |
| | 500-1000 | 2 | 1,5 | 2 | 1,5 |
| | 1000-5000 | 11 | 9 | 11 | 7,5 |
| | 5000-10.000 | 14 | 11 | 14 | 10 |
| Normal-bereich | 10.000 | 92 | 73 | 110 | 77 |
| Gesamt | | 126 | 100 | 144 | 100 |

* von wiederholt untersuchten Patienten wurde nur jeweils die zeitlich erste Untersuchung berücksichtigt

** von wiederholt untersuchten Patienten wurden alle Untersuchungen berücksichtigt

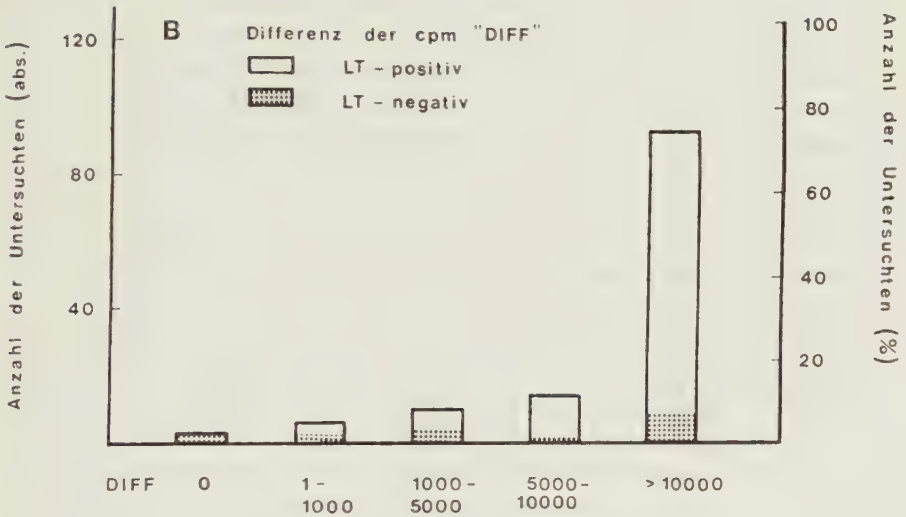


Abb. 4: Antigen-induzierte Lymphoproliferation bei 126 gesunden Probanden: Berechnung der Stimulationsdifferenz (SD)

Ordinate links: Anzahl der Untersuchten (absolut)
rechts: Anzahl der Untersuchten (in Prozent)

Abszisse: Stimulationsdifferenz (SD) in Bereichen

Gepunkteter Anteil der Säulen: Anzahl der Untersuchten ohne Lymphotoxin-Bildung.

### 3.2.3. Lymphoproliferation bei gesunden Probanden: Stimulationsindex und Stimulationsdifferenz

Zwischen dem Stimulationsindex und der Stimulationsdifferenz besteht im Allgemeinen eine enge Korrelation, d.h. mit ansteigender Stimulationsdifferenz steigt auch der Stimulationsindex an (Abb. 2 und 5). Bei der Zuordnung der Probanden zu den "Normbereichen" von Stimulationsdifferenz und Stimulationsindex ergibt sich jedoch nicht in allen Fällen eine Übereinstimmung: So liegen bei Berücksichtigung des Stimulationsindex und der Annahme eines unteren Normwertes von 10 84 % der Untersuchungsergebnisse in diesem Normbereich (Tab. 3.2.1. und Abb. 3) und bei Berücksichtigung der Stimulationsdifferenz und der Annahme eines unteren Normwertes von 10.000 cpm nur 73 % der Untersuchungsergebnisse in diesem Normbereich (Tab. 3.2.2. und Abb. 4); wenn wir den "Normalbereich" auf eine Stimulationsdifferenz größer 5.000 cpm erweitern, so fallen 84 % der Untersuchten in diese Gruppe (Tab. 3.2.2.).

Die 84 % der Probanden mit Normalwerten nach dem Stimulationsindex sind jedoch nicht mit den 84 % im erweiterten Normalbereich nach der Stimulationsdifferenz identisch: 78 % gehören beiden, je 6 % nur einem der Normalbereiche an.

Probanden, bei denen Stimulationsindex und Stimulationsdifferenz nicht korrelieren, sind solche mit entweder sehr hoher oder sehr niedriger 3H-Thymidin-Aufnahme in den Kontrollkulturen (siehe Beispiele in Tab. 3.2.3a). Diese Beispiele zeigen, wie irreführend unter bestimmten Bedingungen (sehr niedrige oder sehr hohe spontane 3H-Thymidin-Aufnahme) die ausschließliche Beurteilung nach Stimulationsindex oder Stimulationsdifferenz sein kann.

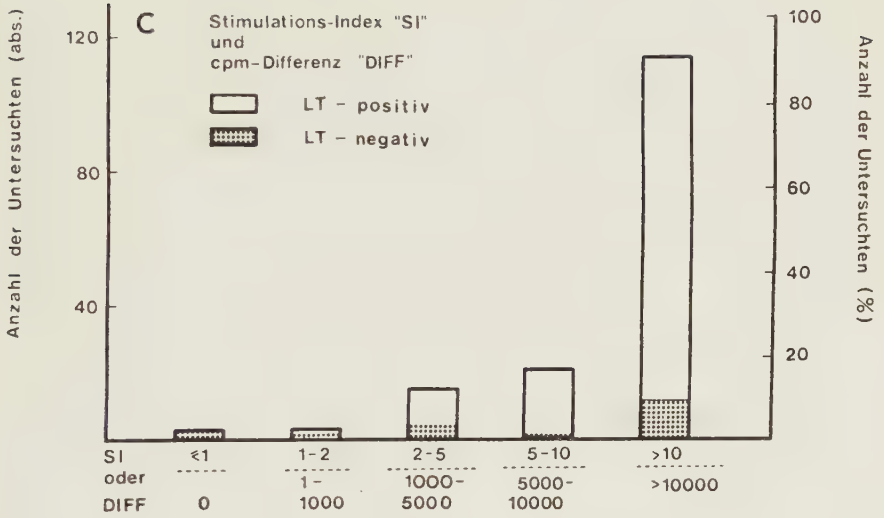


Abb. 5: Antigen-induzierte Lymphoproliferation bei 126 gesunden Probanden: Berechnung des Stimulationsindex (SI) und der Stimulationsdifferenz (SD)

Ordinate links: Anzahl der Untersuchten (absolut)
rechts: Anzahl der Untersuchten (in Prozent)

Abszisse: Stimulationsdifferenz (SD) in Bereichen

Gepunkteter Anteil der Säulen: Anzahl der Untersuchten ohne Lymphotoxin-Bildung.

Tab. 3.2.3.a.

Stimulationsindex und Stimulationsdifferenz bei extrem niedriger und hoher spontaner 3H-Thymidin-Aufnahme

| Versuchs-person | Spontan-proliferation | Lymphopro-liferation | Stimulations-index | Stimulations-differenz |
|---|---|---|---|---|
| S.M. | 61* | 800* | 13.1 | 739 |
| S.R. | 94 | 1512 | 16.0 | 1418 |
| S.H. | 16788 | 43610 | 2.6 | 26822 |
| W.V. | 6889 | 30750 | 4.5 | 23861 |

*Mittelwerte von Doppelbestimmungen in cpm-3H-Thymidin-Aufnahme

Tab. 3.2.3.b.

Auswertung der Ergebnisse unter Berücksichtigung von Stimulationsindex (SI) und Stimulationsdifferenz (SD) (gesunde Kontrollpersonen)

| SD \ SI | 1 | 1-2 | 2-5 | 5-10 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 3*(2%) | | | | |
| 1-500 | | 3 (2%) | 1 (1%) | | |
| 500-1000 | | | 1 (1%) | | 1 (1%) |
| 1000-5000 | | | 2 (2%) | 2 (2%) | 6 (5%) |
| 5000-10000 | | | | | 14 (11%) |
| 10000 | | | 3 (2%) | 5 (4%) | 85 (67%) |

Definition von Normbereichen siehe Kapitel 3.2.6.

* Anzahl der Probanden-von wiederholt untersuchten Probanden wurde nur jeweils die zeitlich erste Untersuchung berücksichtigt

Wir haben deshalb im folgenden versucht, die Untersuchungsergebnisse unter Berücksichtigung von Stimulationsindex und Stimulationsdifferenz zu bewerten (Tab. 3.2.3b).

Einen Stimulationsindex über 10 u n d eine Stimulationsdifferenz über 10.000 cpm fanden wir bei 67 % (n=85) der Untersuchten und einen Stimulationsindex über 10 o d e r eine Stimulationsdifferenz über 10.000 cpm bei 90 % (n=114) der Untersuchten (Abb. 5). In einem Grenzbereich mit einem Stimulationsindex zwischen 1 und 10 und einer Stimulationsdifferenz zwischen 1 und 10.000 cpm fanden wir 8 % (n=9), keine meßbare Reaktion (Negativbereich) fanden wir bei 2 % (n=3) der Untersuchten.

### 3.2.4. Lymphotoxin-Bildung (gesunde Probanden)

Beurteilt man die Reaktion der Lymphozyten nur unter Berücksichtigung der Lymphotoxin-Bildung, so ergibt sich für die 126 gesunden Probanden folgende Verteilung (Tab. 3.2.4): In den Normbereich fallen 86 % (n=108), in den Grenzbereich 1,5 % (n=2) und in den Negativbereich 12,5% (n=16) der Untersuchten. Bei dieser Bewertung haben wir den Normbereich der Lymphotoxin-Bildung definiert als Hemmaktivität über 20 %, der Grenzbereich als Hemmaktivität bis 20 % und den Negativbereich als fehlende Hemmaktivität.

Tab. 3.2.4. Lymphotoxin-Bildung (gesunde Probanden)

| Lymphotoxin | | Zahl der Personen | % | Zahl der Testungen | % |
|---|---|---|---|---|---|
| Negativ-bereich | - | 16 | 12,5 | 18 | 12,5 |
| Grenz-bereich | (+) | 2 | 1,5 | 5 | 3,5 |
| Normal-bereich | + | 108 | 86 | 121 | 84 |
| Gesamt | | 126 | 100 | 144 | 100 |

| | | |
|---|---|---|
| Negativbereich | - | 0 % Hemmung |
| Grenzbereich | (+) | 1 - 20 % Hemmung |
| Normalbereich | + | > 20 % Hemmung |

### 3.2.5. Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Sekretion bei gesunden Probanden

Aus den Berechnungen im Kapitel 3.2.4 geht hervor, daß von 126 gesunden Probanden 86 % normal, 1,5 % schwach und 12,5 % kein Lymphotoxin bilden. Berücksichtigt man neben dieser Reaktion die Lymphoproliferation, so ergibt sich folgendes: Lymphozyten der gesunden Probanden mit Stimulationsindex über 10 und Stimulationsdifferenz über 10.000 cpm bilden in etwa 90 % (77 von 85) normal und in 10 % ( 8 von 85) kein Lymphotoxin (Tab. 3.2.5.).
Die Zahl der Lymphotoxin-negativen Probanden mit Stimulationsindex über 10 oder Stimulationsdifferenz über 10.000 cpm liegt ebenfalls bei 10 % (11 von 114).

Auch bei schwächerer Lymphoproliferation (Grenzbereich) steigt der Anteil Lymphotoxin-negativer Probanden (2 von 9) nicht wesentlich an.
Bemerkenswert ist, daß von den 3 Probanden mit fehlender Lymphoproliferation einer eine schwache Lymphotoxin-Bildung (Hemmung 10 %) zeigt. Dies muß als dissoziierte Reaktion auf die Antigen-Stimulation angesehen werden; man kann also diesen Probanden aus der Gruppe der nicht durch Antigen stimulierbaren Probanden herausnehmen, da seine Lymphozyten gegen Komponenten des Mischantigens sensibilisiert waren und reagieren können.

Unter Berücksichtigung von Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Sekretion finden wir also in einem Kollektiv von 126 gesunden Probanden nur 2 (1,6 %), die keine meßbare Reaktion zeigen (s. auch Abb. 5).

Tab. 3.2.5.

Stimulationsindex (SI), Stimulationsdifferenz (SD) und Lymphotoxin-Bildung (LT) (gesunde Probanden)

| SD: \ SI: | 1 | 1-2 | 2-5 | 5-10 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 2% (n=3)* LT: - 2 (+) 1 + 0 | | | | |
| 1-500 | | 2% (n=3) LT: - 1 (+) 0 + 2 | 1% (n=1) LT: - 0 (+) 1 + 0 | | |
| 500-1000 | | | 1% (n=1) LT: - 1 (+) 0 + 0 | | 1% (n=1) LT: - 0 (+) 0 + 1 |
| 1000-5000 | | | 2% (n=2) LT: - 0 (+) 0 + 2 | 2% (n=2) LT: - 0 (+) 0 + 2 | 5% (n=6) LT: - 3 (+) 0 + 3 |
| 5000-10.000 | | | | | 11% (n=14) LT: - 1 (+) 0 + 13 |
| 10.000 | | | 2% (n=3) LT: - 0 (+) 0 + 3 | 4% (n=5) LT: - 0 (+) 0 + 5 | 67% (n=85) LT: - 8 (+) 0 + 77 |

Lymphotoxin (LT)-Schlüssel siehe Tab. 3.2.4.

Definition von Normbereichen siehe Kapitel 3.2.6.

* Anzahl der Probanden—von wiederholt untersuchten Probanden wurde nur jeweils die zeitlich erste Untersuchung berücksichtigt

### 3.2.6. Definition von Normwerten

Die Beurteilung der Lymphozyten-Stimulation erfolgte in dieser Untersuchung nach dem Stimulationsindex (SI), der Stimulationsdifferenz (SD), der Kombination aus beiden und der Lymphotoxinsekretion (LT).
Dabei unterteilten wir die Ergebnisse jeweils in einen Norm-, Grenz- und Negativbereich.

Bei der Beurteilung nach dem Stimulationsindex (SI) entsprach dem Normbereich ein SI über 10, dem Grenzbereich ein SI zwischen 1 und 10, dem Negativbereich ein SI von kleiner 1.

Bei der Beurteilung nach der Stimulationsdifferenz (SD) entsprach dem
Normbereich eine SD über 10.000 cpm, dem
Grenzbereich eine SD zwischen 1 und 10.000 cpm, dem
Negativbereich eine SD von 0.

Bei der Beurteilung der Lymphoproliferation sowohl nach Stimulationsindex (SI) als auch nach Stimulationsdifferenz (SD) unterteilten wir den Normbereich in einen
Normbereich A, entsprechend einem SI über 10 und einer SD über 10.000 cpm, und einen
Normbereich $A_{1+2}$, entsprechend (1) einem SI über 10 oder (2) einem SD über 10.000 cpm.
Im weiteren unterteilten wir in den
Grenzbereich B, entsprechend einem SI zwischen 1 und 10, oder einer SD zwischen 1 und 10.000 cpm, und den
Negativbereich C, entsprechend einem SI kleiner als 1 und einer SD von 0.

Bei der Beurteilung nach der Lymphotoxinsekretion (LT) entsprach dem Normbereich + eine Hemmung über 20 %, dem Grenzbereich (+) eine Hemmung zwischen 1 und 20 %, dem Negativbereich - eine Hemmung von 0 %.

Bei der gleichzeitigen Beurteilung von Lymphoproliferation und Lymphotoxinsekretion entsprach dem

Normbereich eine Lymphoproliferation im Bereich A
oder $A_{1+2}$
oder eine Hemmung über 20 %; dem

Grenzbereich entweder eine Lymphoproliferation im Bereich B oder C
und eine Lymphotoxinsekretion zwischen 1 % und 20 %
oder eine Lymphoproliferation im Bereich B
und eine Lymphotoxinsekretion unter 20 %; dem

Negativbereich eine Lymphoproliferation im Bereich C und eine fehlende Lymphotoxinsekretion.

### 3.2.7. Mehrfachuntersuchungen einzelner Probanden

Von 12 der 126 gesunden Probanden wurden die Lymphozyten mehrfach untersucht; zehn Probanden wurden 2 mal, ein Proband 4 mal und ein weiterer 6 mal untersucht (Tab. 3.2.7.).

Die Lymphoproliferation lag bei 11 der Probanden bei allen Untersuchungen im Normbereich und bei einem der Probanden (FM) lag sie einmal im Norm- und einmal im Grenzbereich. Dieser Proband zeigte bei beiden Untersuchungen eine normale Lymphotoxin-Bildung.

Die Lymphotoxin-Werte lagen bei 10 der Probanden bei allen Untersuchungen im Normbereich; bei einem der Probanden (HaM) wechselte die Lymphotoxin-Aktivität vom Norm- zum Grenzbereich und bei einem weiteren (FG), dessen Lymphoproliferation 4 mal im Normbereich lag, fanden wir die Lymphotoxin-Aktivität 2 mal im Grenzbereich und je 1 mal im Norm- bzw. Negativbereich.

Insgesamt zeigen die Mehrfachuntersuchungen also für den jeweiligen Probanden eine relative Konstanz der Ergebnisse.

Tab. 3.2.7.

Lymphoproliferations- und Lymphotoxinwerte von 12 mehrfach untersuchten gesunden Probanden

| Lymphoproliferation | | A | | | $A_{1+2}$ | | | B | | | C | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lymphotoxinbildung | | + | (+) | - | + | (+) | - | + | (+) | - | + | (+) | - |
| Name | Anzahl der Untersuchungen | | | | | | | | | | | | |
| B.M. | 2 | 2 | 0 | 0 | | | | | | | | | |
| F.M. | 2 | 1 | 0 | 0 | | | | 1 | 0 | 0 | | | |
| F.G. | 4 | | | | 4 | 2 | 1 | | | | | | |
| Fi.M. | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | |
| H.M. | 2 | 2 | 0 | 0 | | | | | | | | | |
| Ha.M. | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | |
| L.V. | 2 | 2 | 0 | 0 | | | | | | | | | |
| N.M. | 2 | 2 | 0 | 0 | | | | | | | | | |
| P.M. | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | |
| T.M. | 6 | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | |
| W.B. | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | |
| R.A. | 2 | 2 | 0 | 0 | | | | | | | | | |

Lymphoproliferation: Definition siehe Kapitel 3.2.6.
Lymphotoxinbildung: Definition siehe Kapitel 3.2.6.

## 3.3. Stimulation von Lymphozyten einer Gruppe von Patienten

Als Reaktion auf die Antigen-Stimulation wurden auch hier die Lymphoproliferation und die Lymphotoxin-Sekretion bestimmt: Abb. 6 gibt eine Übersicht über die Lymphoproliferation nach Antigen-Stimulation und Tab. 3.3.4 eine Übersicht über die Lymphotoxin-Sekretion der 137 Patienten.

### 3.3.1. Lymphoproliferation bei Patienten: Stimulationsindex

Beurteilt man die Lymphoproliferation nur unter Berücksichtigung des Stimulationsindex, so ergibt sich für die 137 Patienten folgende Verteilung (Tab. 3.3.1.).
63 % (n=87) der Patienten reagierten mit einem Stimulationsindex über und 37 % (n=50) mit einem Stimulationsindex unter 10.
Unterteilt man die Gruppe der schwächer Reagierenden (Stimulationsindex unter 10), so findet man
bei 10 % (n=13) einen Stimulationsindex zwischen 5 und 10,
bei 10 % (n=13) einen Stimulationsindex zwischen 2 und 5,
bei 5 % (n=7) einen Stimulationsindex zwischen 1 und 2 und
bei 12 % (n=17) einen Stimulationsindex von 1.

Nach dieser Auswertung finden wir also bei 12 % der Patienten (Kontrollgruppe: 2 %) keine meßbare Reaktion; bei 25 % eine Reaktion im Grenzbereich (Kontrollgruppe: 14 %) und eine normale Reaktion bei 63 % (Kontrollgruppe: 84 %).

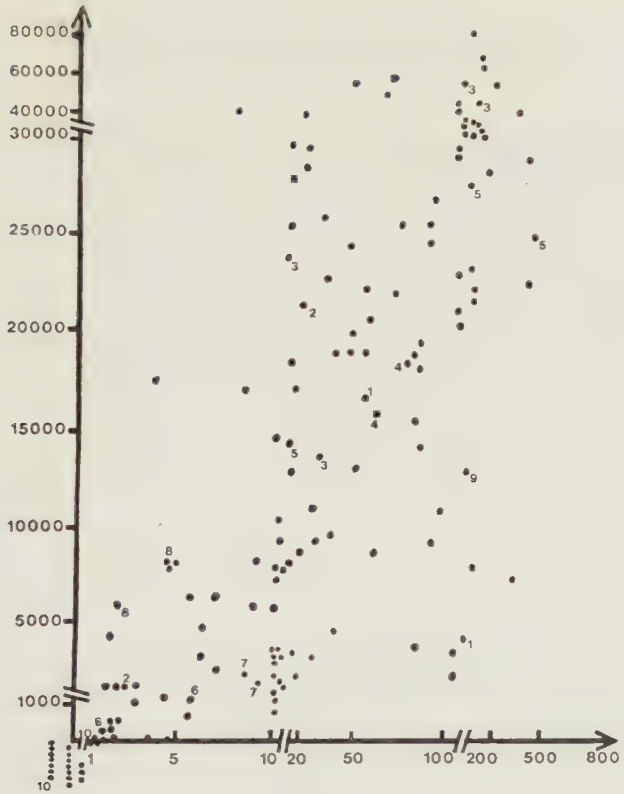


Abb. 6: Antigen-induzierte Lymphoproliferation bei 137 Patienten: Beziehung zwischen Stimulationsdifferenz (SD) und Stimulationsindex (SI)

Ordinate: Stimulationsdifferenz (cpm)
Abszisse: Stimulationsindex

Die mit Nummern gekennzeichneten Punkte geben Mehrfachuntersuchungen einzelner Patienten wieder.

Tab. 3.3.1. Stimulationsindex (SI) bei Patienten

| Stimulationsindex | | Zahl der Patienten* | % | Anzahl der Untersuchungen** | % |
|---|---|---|---|---|---|
| Negativbereich | 1 | 17 | 12 | 17 | 11 |
| Grenzbereich | 1-2 | 7 | 5 | 8 | 5 |
| | 2-5 | 13 | 10 | 14 | 9 |
| | 5-10 | 13 | 10 | 13 | 9 |
| Normbereich | 10 | 87 | 63 | 102 | 66 |
| Gesamt | | 137 | 100 | 154 | 100 |

* von wiederholt untersuchten Patienten wurde nur jeweils die zeitlich erste Untersuchung berücksichtigt

** von wiederholt untersuchten Patienten wurden alle Untersuchungen berücksichtigt

### 3.3.2. Lymphoproliferation bei Patienten: Stimulationsdifferenz

Beurteilt man die Lymphoproliferation nur unter Berücksichtigung der Stimulationsdifferenz, so ergibt sich für die 137 Patienten folgende Verteilung (Tab. 3.3.2.):
47 % (n=64) der Patienten reagierte mit einer Stimulationsdifferenz über und 53 % (n=73) mit einer Stimulationsdifferenz unter 10.000 cpm. Unterteilt man die Gruppe der schwächer Reagierenden (Stimulationsdifferenz unter 10.000 cpm) weiter, so findet man
bei 12 % (n=16) eine Stimulationsdifferenz zwischen 5.000 und 10.000 cpm,
bei 20 % (n=28) eine Stimulationsdifferenz zwischen 1.000 und 5.000 cpm,
bei 3 % (n=4) eine Stimulationsdifferenz zwischen 500 und 1.000 cpm,
bei 6% (n=8) eine Stimulationsdifferenz zwischen 1 und 500 cpm,
und bei 12 % (n=17) eine Stimulationsdifferenz von 0.

Nach dieser Auswertung finden wir also bei 12 % der Untersuchten keine meßbare Reaktion (Kontrollgruppe: 2,5 %), eine Reaktion im Grenzbereich bei 41 % (Kontrollgruppe: 16 %) und eine normale Reaktion bei 47 % der Untersuchten (Kontrollgruppe: 73 %).

Tab. 3.3.2. Stimulationsdifferenz (Patienten)

| Stimulationsdifferenz | | Zahl der Probanden* | % | Zahl der Untersuchungen** | % |
|---|---|---|---|---|---|
| Negativ-bereich | 0 | 17 | 12 | 17 | 11 |
| | 1-500 | 8 | 6 | 9 | 6 |
| Grenz- | 500-1000 | 4 | 3 | 4 | 3 |
| bereich | 1000-5000 | 28 | 20 | 29 | 19 |
| | 5000-10.000 | 16 | 12 | 18 | 12 |
| Norm-bereich | 10.000 | 64 | 47 | 77 | 49 |
| Gesamt | | 137 | 100 | 154 | 100 |

* von wiederholt untersuchten Patienten wurde nur jeweils die zeitlich erste Untersuchung berücksichtigt

** von wiederholt untersuchten Patienten wurden alle Untersuchungen berücksichtigt

### 3.3.3. Lymphoproliferation bei Patienten: Stimulationsindex und Stimulationsdifferenz

Beurteilt man die Ergebnisse nun unter gleichzeitiger Berücksichtigung von Stimulationsindex und Stimulationsdifferenz, so ergibt sich für die 137 Patienten folgende Verteilung (Tab. 3.3.3.):
In den Normbereich A der Lymphoproliferation fallen 43 % (n = 59) (Kontrollgruppe: 67 %) und in den Normbereich $A_{1+2}$ 67,5 % (n = 92) (Kontrollgruppe: 90 %) der Untersuchten. Bei 20,5 % (n = 28) der Probanden lag die Reaktion im Grenzbereich (Kontrollgruppe: 8 %).
Keine meßbare Reaktion (Bereich C) fanden wir bei 12 % (n = 17) der Untersuchten (Kontrollgruppe: 2 %).

Tab. 3.3.3.

Stimulationsindex (SI) und Stimulationsdifferenz (SD) (Patienten)

| SD \ SI | 1 | 1-2 | 2-5 | 5-10 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 17* (12 %) | | | | |
| 1-500 | | 5 (3,5 %) | 3 (2,0 %) | | |
| 500 - 1000 | | | 2 (1,5 %) | 1 (1 %) | 1 (1 %) |
| 1000 - 5000 | | 2 (1,5 %) | 5 (3,5 %) | 4 (3 %) | 17 (12%) |
| 5000 - 10000 | | | 2 (1,5 %) | 4 (3 %) | 10 (7,5%) |
| 10000 | | | 1 (1 %) | 4 (3 %) | 59 (43%) |

Definition von Normbereichen siehe Tab. 3.2.6.

* Anzahl der Patienten-von wiederholt untersuchten Patienten wurde nur jeweils die zeitlich erste Untersuchung berücksichtigt

### 3.3.4. Lymphotoxin-Bildung bei Patienten

Beurteilt man die Reaktion der Lymphozyten nur unter Berücksichtigung der Lymphotoxin-Bildung, so ergibt sich für die 137 Patienten folgende Verteilung (Tab. 3.3.4.).
(Bewertung s. Kapitel 3.2.4.).
Eine Lymphotoxin-Bildung im Normbereich fanden wir bei 53 % (n=73) (Kontrollgruppe 86 %), im Grenzbereich bei 25 % (n=34) (Kontrollgruppe 1,5 %) und im Negativbereich bei 22 % (n=30) (Kontrollgruppe 12,5 %) der Untersuchten.

Tab. 3.3.4. Lymphotoxin-Reaktion (Patienten)

| Lymphotoxin-Bildung | | Zahl der Personen | % | Zahl der Testungen | % |
|---|---|---|---|---|---|
| Negativ-bereich | - | 30 | 22 | 33 | 21 |
| Grenz-bereich | (+) | 34 | 25 | 38 | 25 |
| Norm-bereich | + | 73 | 53 | 83 | 54 |
| Gesamt | | 137 | 100 | 154 | 100 |

Negativbereich - 0 % Hemmung
Grenzbereich (+) 1 bis 20 % Hemmung
Normbereich + > 20 % Hemmung

### 3.3.5. Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Sekretion bei Patienten: Stimulationsindex, Stimulationsdifferenz und Lymphotoxin-Sekretion

Aus den Berechnungen in Kapitel 3.3.4. ergibt sich, daß von den 137 Patienten 53 % normal, 25 % schwach und 22 % kein Lymphotoxin bilden.
Berücksichtigt man neben dieser Reaktion die Lymphoproliferation, so ergibt sich folgendes: Die Lymphozyten der Patienten mit Lymphoproliferation im Normbereich "A" bilden zu 75 % (44 von 59) normal, zu 15 % (9 von 59) grenzwertig und zu 10 % (6 von 59) kein Toxin (Tab. 3.3.5.).
Die Zahl der Lymphotoxin-negativen Patienten mit Lymphoproliferation im Normbereich "$A_{1+2}$" liegt bei 14 % (13 von 92).

Bei Patienten mit schwächerer Lymphoproliferation (Grenzbereich) liegt der Anteil Lymphotoxin-negativ reagierender Patienten bei 36 % (10 von 28).
41 % (7 von 17) der Patienten mit fehlender Lymphoproliferation liegen auch im Negativbereich der Lymphotoxin-Bildung.
4 von 17 lymphoproliferativ-Negativen zeigten eine Lymphotoxin-Bildung; diese war viermal im Normbereich.

Unter Berücksichtigung von Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Sekretion finden wir also in einem Kollektiv von 137 Patienten ca. 5 % (n=7) die keine meßbare Reaktion zeigen (Kontrollgruppe 2 %).

Tab. 3.3.5.

Stimulationsindex (SI), Stimulationsdifferenz (SD) und Lymphotoxinsekretion (LT) (Patienten)

| SD: \ SI: | 1 | 1-2 | 2-5 | 5-10 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 12% (n=17)*<br>LT: - 7<br>(+) 6<br>+ 4 | | | | |
| 1-500 | | 3,5% (n=5)<br>LT: - 2<br>(+) 1<br>+ 2 | 2% (n=3)<br>LT: - 1<br>(+) 2<br>+ 0 | | |
| 500-1000 | | | 1,5% (n=2)<br>LT: - 0<br>(+) 2<br>+ 0 | 1% (n=1)<br>LT: - 0<br>(+) 1<br>+ 0 | 1% (n=1)<br>LT: - 0<br>(+) 0<br>+ 1 |
| 1000-5000 | | 1,5% (n=2)<br>LT: - 2<br>(+) 0<br>+ 0 | 3,5% (n=5)<br>LT: - 3<br>(+) 1<br>+ 1 | 3% (n=4)<br>LT: - 1<br>(+) 1<br>+ 2 | 13% (n=17)<br>LT: - 5<br>(+) 3<br>+ 9 |
| 5000-10.000 | | | 1,5% (n=2)<br>LT: - 0<br>(+) 2<br>+ 0 | 3% (n=4)<br>LT: - 1<br>(+) 2<br>+ 1 | 9% (n=10)<br>LT: - 2<br>(+) 4<br>+ 4 |
| 10.000 | | | 1 % (n=1)<br>LT: - 0<br>(+) 0<br>+ 1 | 1,5% (n=4)<br>LT: - 0<br>(+) 0<br>+ 4 | 42% (n=59)<br>LT: - 6<br>(+) 9<br>+ 44 |

Lymphotoxin (LT) -Schlüssel siehe Tab. 3.2.4.

Definition von Normbereichen siehe Kapitel 3.2.6.

* Anzahl der Patienten-von wiederholt untersuchten Patienten wurde nur jeweils die zeitlich erste Untersuchung berücksichtigt

### 3.3.6 Mehrfachuntersuchungen einzelner Patienten

Von 10 der 137 Patienten wurden die Lymphozyten mehrfach untersucht: acht Patienten 2 mal, ein Patient 3 mal und ein weiterer Patient 4 mal (Tab. 3.3.6.).

Bei sieben Patienten bestätigte die Wiederholungsuntersuchung den Bereich der Erstuntersuchung bezogen auf die Lymphoproliferation. Zwei Patienten wechselten bei der Wiederholungsuntersuchung vom Norm- zum Grenzbereich und ein Patient vom Grenz- zum Negativbereich.

Die Lymphotoxin-Bildung wechselte bei 5 Patienten zwischen dem Norm- und Grenzbereich und blieb bei den übrigen 5 Patienten konstant. Patienten, die einmal lymphotoxin-negativ reagierten (R.S./ K.H./ P.K.), blieben auch bei Wiederholungsuntersuchungen im Negativbereich.

Insgesamt zeigen die Mehrfachuntersuchungen also für den jeweiligen Patienten eine relative Konstanz der Ergebnisse.

Tab. 3.3.6

Lymphoproliferations- und Lymphotoxinwerte von 10 mehrfach untersuchten Patienten

| Lymphoproliferation | | A | | | $A_{1+2}$ | | | B | | | C | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lymphotoxinbildung | | + | (+) | - | + | (+) | - | + | (+) | - | + | (+) | - |
| Name | Anzahl der Untersuchungen | | | | | | | | | | | | |
| B.S. | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | |
| F.T. | 2 | | 1 | | | | | | 1 | | | | |
| | | 1 | 0 | 0 | | | | 0 | 1 | 0 | | | |
| F.M. | 4 | | 4 | | | | | | | | | | |
| | | 3 | 1 | 0 | | | | | | | | | |
| R.S. | 2 | | 2 | | | | | | | | | | |
| | | 0 | 0 | 2 | | | | | | | | | |
| S.J. | 3 | | 3 | | | | | | | | | | |
| | | 2 | 1 | 0 | | | | | | | | | |
| K.H. | 2 | | | | | | | | 2 | | | | |
| | | | | | | | | 0 | 0 | 2 | | | |
| P.K. | 2 | | | | | | | | 2 | | | | |
| | | | | | | | | 0 | 0 | 2 | | | |
| R.E. | 2 | | | | | | | | 2 | | | | |
| | | | | | | | | 0 | 2 | 0 | | | |
| K.G. | 2 | | 1 | | | | | | 1 | | | | |
| | | 1 | 0 | 0 | | | | 0 | 1 | 0 | | | |
| W.W. | 2 | | | | | | | | 1 | | | 1 | |
| | | | | | | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

Lymphoproliferation: Definition siehe Kapitel 3.2.6.
Lymphotoxinbildung: Definition siehe Kapitel 3.2.6.

## 3.4. Untersuchungen an "Patienten" mit bestimmten Erkrankungen

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse von Lymphozytenfunktions-Untersuchungen beschrieben, die an Patienten mit verschiedenen - gesicherten und vermuteten - Diagnosen durchgeführt wurden.
Insgesamt haben wir Patienten mit 24 verschiedenen Erkrankungen untersucht; am häufigsten solche mit Zöliakie und ALL.
Unter den hier erfaßten "Patienten" sind auch klinisch gesunde Geschwister von Patienten mit Zöliakie (Kinder-Kontrollgruppe), denen im Rahmen einer HLA-Typisierung von Familien mit Zöliakie (Untersuchungen Prof. Harms/ Prof. Albert) zusätzlich Blut für unsere Untersuchungen abgenommen wurde.

Tab. 3.4.a. gibt eine Übersicht über die Zahl der (insgesamt137) "Patienten" innerhalb der einzelnen Erkrankungsgruppen und die Ergebnisse der Lymphozytenfunktions-Untersuchungen.

Tab. 3.4.a. Lymphoproliferation und Lymphotoxinsekretion bei Patienten mit bestimmten Erkrankungen im Vergleich zu Kontrollgruppen

| Lymphoproliferation | A | | | $A_{1+2}$ | | | B | | | C | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lymphotoxinsekretion | + | (+) | - | + | (+) | - | + | (+) | - | + | (+) | - |
| Kontrollgruppe Erwachsene n = 126 | 77 | 85 0 | 8 | 25 | 29 0 | 4 | 6 | 9 1 | 2 | 0 | 3 1 | 2 |
| Patientengruppe n = 112 | 29 | 39 7 | 3 | 16 | 29 6 | 7 | 6 | 27 12 | 9 | 4 | 17 6 | 7 |
| Diagnosen | | | | | | | | | | | | |
| Kontrollgruppe Kinder Geschwister von Pat. mit Zöliakie | 15 | 20 2 | 3 | 3 | 4 1 | 0 | | | | | | |
| Mutter eines Kindes mit Zöliakie | | | | | | | 0 | 1 0 | 1 | | | |
| Zöliakie | 15 | 15 0 | 0 | 1 | 1 0 | 0 | 1 | 5 2 | 2 | 0 | 1 1 | 0 |
| AML | | | | | | | 1 | 1 0 | 0 | 0 | 1 1 | 0 |
| CML | | | | 1 | 1 0 | 0 | | | | | | |
| ALL | 4 | 10 4 | 2 | 4 | 10 2 | 4 | 1 | 6 2 | 3 | 1 | 8 0 | 7 |
| SSPE | | | | | | | 0 | 1 0 | 1 | 0 | 1 1 | 0 |
| IgA-Mangel | | | | 1 | 2 0 | 1 | | 1 | 0 | 0 | | |
| rez. bronchopulmonale Infekte | 2 | 3 0 | 1 | 2 | 4 0 | 4 | 0 | 2 | 3 1 | 0 | 1 0 | 1 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| rez. Haut-abszesse | 2 | 2<br>0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| M.Hodgkin | 1 | 1<br>0 | 0 | 3 | 3<br>0 | 0 | | | | | | 0 | 2<br>0 | 2 | |
| Thrombo-cytopenie | | | | | | | 0 | 1<br>1 | 0 | 1 | 1<br>0 | 0 | | | |
| Wilms-Tumor | 1 | 3<br>2 | 0 | 1 | 3<br>1 | 1 | 0 | 1<br>0 | 1 | 0 | 1<br>0 | 1 | | | |
| Autoimmun-erkrank. | 1 | 2<br>0 | 1 | 1 | 2<br>0 | 1 | 0 | 2<br>0 | 2 | | | | | | |
| M.Crohn | 1 | 1<br>0 | 0 | 0 | 1<br>1 | 0 | | | | | | | | | |
| Pneumonie | | | | 0 | 1<br>0 | 1 | | | | | | | | | |
| aplast. Anämie | 1 | 1<br>0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| Asthma | | | | | | | | | | 1 | 1<br>0 | 0 | | | |
| Down-Syndrom | | | | | | | 0 | 1<br>0 | 1 | | | | | | |
| Lympho-sarkom | | | | | | | 0 | 1<br>1 | 0 | | | | | | |
| Bruton | 1 | 1<br>0 | 0 | | | | 0 | 1<br>1 | 0 | | | | | | |
| Progressiver zellulärer Immundefekt | | | | | | | 0 | 1<br>0 | 1 | | | | | | |
| Granulome | | | | | | | 0 | 1<br>0 | 1 | | | | | | |
| Nephrot. Syndrom | | | | | | | 0 | 1<br>0 | 1 | | | | | | |

[illegible] siehe Kapitel 3.2.6.

Untersuchungen an Patienten

Die folgenden Untersuchungen wurden an Kindern mit verschiedenen Erkrankungen durchgeführt. Da die anhand der Befunde der gesunden erwachsenen Probanden definierten Normwerte nicht ohne weiteres auf Kinder übertragen werden konnten, mußten wir uns zunächst versichern, daß die Reaktionen der Lymphozyten gesunder Kinder nicht wesentlich von denen gesunder Erwachsener abweichen.

Im Rahmen von Familienuntersuchungen konnten wir 24 gesunde Geschwister von Patienten mit Zöliakie untersuchen.

Tab. 3.4.b.

Lymphoproliferation bei Erwachsenen und gesunden Kindern im Vergleich

| | Erwachsene | ges. Kinder |
|---|---|---|
| Normbereich | 90 % | 100 % |
| Grenzbereich | 8 % | 0 % |
| Negativbereich | 2 % | 0 % |

Tab. 3.4.c.

Lymphotoxinbildung bei Erwachsenen und gesunden Kindern im Vergleich

| | Erwachsene | ges. Kinder |
|---|---|---|
| Normbereich | 86 % | 75 % |
| Grenzbereich | 1,5 % | 12,5 % |
| Negativbereich | 12,5 % | 12,5 % |

Dabei fanden wir, daß die Lymphoproliferation gesunder Kinder den Normwerten Erwachsener entspricht, ja insgesamt etwas stärker ist, daß aber die Lymphotoxinsekretion bei Kindern etwas schwächer ist. (Vgl. Tab. 3.4.b. und 3.4.c.). Insgesamt fanden wir bei den Kindern (wenn Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Sekretion berücksichtigt werden), eine etwas stärkere Reaktion der Lymphozyten auf das Antigen-Gemisch III als bei gesunden Erwachsenen (Tab. 3.4.d.).

Beurteilen wir nun die Ergebnisse der Patienten (Kinder) gegenüber denen der Kontrollpersonen (Erwachsene), so fallen unter gleichzeitiger Berücksichtigung von Lymphoproliferation und Lymphotoxinbildung in den Normbereich 70 % (n=78) gegenüber 95 % der Kontrollpersonen, in den Grenzbereich 24 % (n=27) gegenüber 3,5 % und in den Negativbereich 6 % (n=7) gegenüber 1,5 % (n=2) der Kontrollpersonen. Das heißt, daß die Gruppe der Patienten insgesamt schwächer auf das Antigengemisch reagiert als die Erwachsenen-Kontrollgruppe und insbesondere als die Kinder-Kontrollgruppe.

Tab. 3.4.d.

Lymphoproliferation und Lymphotoxinbildung bei Erwachsenen und gesunden Kindern im Vergleich

| | Erwachsene | ges. Kinder |
|---|---|---|
| Normbereich | 95 % | 100 % |
| Grenzbereich | 3,5 % | 0 % |
| Negativbereich | 1,5 % | 0 % |

Lymphozytenfunktion bei Patienten im Vergleich zur Erwachsenen- und Kinder-Kontrollgruppe

Lymphoproliferation

In den Normbereich (Gruppe A, $A_{1+2}$) fallen 68, das sind 60 % der 112 Patienten (Erwachsenen-Kontrollgruppe 90 %, Kinder-Kontrollgruppe: 100 %); in den Grenzbereich der Lymphoproliferation (Gruppe B) fallen 27, das sind 24 %, der Patienten (Erwachsenen-Kontrollgruppe: 8 %, Kinder-Kontrollgruppe: 0 %); in den negativen Bereich (Gruppe c) fallen 17, das sind 16 %, der Patienten (Erwachsenen-Kontrollgruppe 2 %; Kinder-Kontrollgruppe: 0 %). (Tab. 3.4.e.).

Der Anteil der Patienten (Kinder) mit grenzwertiger und pathologisch niedriger Lymphoproliferation ist also im Vergleich zur Kontrollgruppe (Erwachsene) deutlich erhöht.

Lymphotoxinbildung

Ähnlich, jedoch noch wesentlich ausgeprägter sind die Unterschiede zwischen den Patienten und den Kontrollgruppen (Erwachsene, Kinder) in Bezug auf die Lymphotoxinbildung: In den Normbereich (Tab. 3.4.f.) fallen 49 % der Patienten (Erwachsenen-Kontrollgruppe: 86 %, Kinder-Kontrollgruppe: 75 %), in den Grenzbereich 28 % (Erwachsenen-Kontrollgruppe: 2,5 %, Kinder-Kontrollgruppe: 12,5 %) und in den Negativbereich 23 % (Erwachsenen-Kontrollgruppe: 12 %, Kinder-Kontrollgruppe: 12,5 %).

Tab. 3.4.e

Lymphoproliferation bei Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen

| Bereich | $A_1$ $A_{1+2}$ | B | C |
|---|---|---|---|
| P<br>n = 112 | 60 % | 24 % | 16 % |
| $K_E$<br>n = 126 | 90 % | 8 % | 2 % |
| $K_K$<br>n = 24 | 100 % | 0 % | 0 % |

P = Patienten
$K_E$ = Erwachsenenkontrollgruppe
$K_K$ = Kinderkontrollgruppe

Definition von Normbereichen siehe Kapitel 3.2.6.

Tab. 3.4.f

Lymphotoxinbildung bei Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen

| Bereich | + | (+) | - |
|---|---|---|---|
| P<br>n = 112 | 49 % | 28 % | 23 % |
| $K_E$<br>n = 126 | 86 % | 2 % | 12 % |
| $K_K$<br>n = 24 | 75 % | 12,5 % | 12,5 % |

P = Patienten
$K_E$ = Erwachsenenkontrollgruppe
$K_K$ = Kinderkontrollgruppe

Definition von Normbereichen siehe Kapitel 3.2.6.

Im folgenden werden die Untersuchungsergebnisse der Patienten mit Zöliakie und ALL ausführlicher beschrieben.

### 3.4.1. Patienten mit Zöliakie

22 Patienten waren an Zöliakie erkrankt; die Diagnose war durch eine Dünndarmbiopsie gesichert worden.
Die Lymphozytenfunktionen der Patienten mit Zöliakie (n=22) waren teilweise erheblich gestört:
Im Normbereich der Lymphoproliferation lagen 73 % (Erwachsenenkontrollgruppe: 90 %; Kinder-Kontrollgruppe: 100 %), im Grenzbereich 23 % (Erwachsenen-Kontrollgruppe: 8 %; Kinderkontrollgruppe: 0 %), im Negativbereich 4 % (Erwachsenen-Kontrollgruppe: 2 %, Kinder-Kontrollgruppe: 0 %).

In den Normbereich der Lymphotoxinsekretion fielen 77 % (Erwachsenen-Kontrollgruppe: 86 %; Kinder-Kontrollgruppe: 75 %), den Grenzbereich 9 % (Erwachsenen-Kontrollgruppe: 2 %; Kinder-Kontrollgruppe 12,5 %), den Negativbereich 14 % (Erwachsenen-Kontrollgruppe 12 %; Kinder-Kontrollgruppe: 12,5 %).

Während also die Lymphotoxinbildung in der Gruppe der Zöliakie-Patienten etwa der der Erwachsenen-Kontrollgruppe und der der Kinder-Kontrollgruppe entsprach, war die Stärke der Lymphoproliferation gegenüber den Vergleichsgruppen vermindert.
Wir haben im folgenden versucht, eine Erklärung für die geringere Lymphoproliferation der Patienten zu geben:

1. Das Alter der schlechter reagierenden Patienten (Gruppe B und C) lag zwischen 11 und 67 Monaten (Mittelwert: 23 Monate, das der Patienten in den Gruppe A und $A_{1+2}$ zwischen 14 und 155 Monaten (Mittelwert: 47 Monate).

2. Zwischen dem Zeitpunkt der Diagnose (Dünndarmbiopsie) und dem Zeitpunkt der Lymphozytenuntersuchung, das ist in etwa die Dauer der glutenfreien Ernährung der Kinder vor der Untersuchung, lagen in der Gruppe der schlecht reagierenden Patienten 1 bis 15 Monate (Mittelwert: 6 Monate) und in der Gruppe der normal reagierenden Patienten 3 bis 48 Monate (Mittelwert: 25 Monate).
3. Diätfehler, soweit sie aus Angaben der Patienten und der Eltern vermutet werden können, sind bei einem der schlecht reagierenden Patienten und bei fünf der normal reagierenden Patienten anzunehmen.

Die beiden Gruppen der Patienten, die in den Gruppen B und C und die in den A-Gruppen, unterscheiden sich also im wesentlichen dadurch, daß die schlechter reagierenden erst kürzere Zeit unter einer glutenfreien Diät stehen, sodaß der (abklingende) Einfluß der akuten Zöliakie als Ursache für die verminderte Reaktivität der Lymphozyten verantwortlich sein könnte. Das Durchschnittsalter dieser Kinder ist zwar kleiner, es könnte deshalb auch eine (noch) schwächere Sensibilisierung als Ursache für die Hyporeaktivität in Frage kommen. Die Ergebnisse der Patienten mit ALL (Kapitel 3.4.2.) sprechen jedoch gegen eine Altersabhängigkeit der Untersuchungsergebnisse, sodaß wir tatsächlich die Zöliakie als Ursache der verminderten Reaktivität ansehen können.

Tab. 3.4.1.: Lymphozytenfunktion bei Kindern mit Zöliakie

| Name | Alter bei Diagnose (Mon.) | Alter bei Ly-Unter-suchung (Mon.) | Δ (Mon.) | Gruppe LyP | Gruppe LT | glutenfreie Diät |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G.B. | 14 | 15 | 1 | C | - | ja |
| M.A. | 12 | 14 | 2 | B | (+) | ja |
| O.C. | 7 | 15 | 8 | B | + | ja |
| V.G. | 10 | 11 | 1 | B | - | ja |
| K.S. | 7 | 14 | 7 | B | - | ja |
| W.B. | 52 | 67 | 15 | B | (+) | fraglich |
| B.B. | 14 | 60 | 46 | A | + | Diätfehler |
| D.S. | 12 | 21 | 9 | A | + | ja |
| H.T. | 11 | 45 | 34 | A | + | ja |
| H.St. | 14 | 17 | 3 | A | + | ja |
| K.B. | 7 | 38 | 31 | A | + | ja |
| K.R. | 14 | 62 | 48 | A | + | ja |
| L.H. | 12 | 29 | 17 | A | + | ja |
| M.C. | 9 | 18 | 9 | A | + | ja |
| Sch.D. | 14 | 48 | 34 | A | + | ja |
| Sch.J. | 39 | 69 | 30 | A | + | ja |
| V.G. | 12 | 44 | 32 | A | + | Diätfehler |
| W.M. | 10 | 14 | 4 | A | + | ja |
| Z.B. | 15 | 30 | 15 | A | + | Diätfehler |
| A.A. | 131 | 155 | 24 | A | + | fraglich |
| Sch.M. | 18 | 66 | 48 | A | + | Diätfehler |
| K.G. | 12 | 32 | 20 | $A_{1+2}$ | + | ja |

Definition von Normbereichen siehe Kapitel 3.2.6.

Einteilungen der Therapiestadien:

Stadium 1 bei Diagnose
Stadium 2 bei Induktionstherapie
Stadium 3 bei Bestrahlung
Stadium 4 bei Erhaltungstherapie
Stadium 5 nach Absetzen
Stadium 6 bei Rezidiv

### 3.4.2. Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Es wurden Lymphozyten von 34 Patienten mit ALL untersucht. Wir gehen im folgenden näher auf die Beziehung zwischen dem Alter der Kinder, dem Therapiestadium und der Reaktion der Lymphozyten auf die Stimulation mit dem Mischantigen III ein (Tab. 3.4.2.a.).

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Kinder der Gruppe A durchschnittlich 123 Monate, in Gruppe $A_{1+2}$ 124 Monate, in Gruppe B 64 Monate und in Gruppe C 108 Monate alt. Ein Zusammenhang zwischen verminderter Lymphozytenfunktion und niedrigem Lebensalter ließ sich also nicht ableiten.

Aus den Befunden (Tab. 3.4.2.b.) läßt sich auch kein Zusammenhang zwischen dem Stadium bzw. der Dauer der Therapie und der Störung der Lymphoproliferation herstellen. Wir fanden in Gruppe C gegenüber den Gruppen A und $A_{1+2}$ keine Häufung von Kindern, die bei Diagnosestellung oder im Rezidiv untersucht wurden. Wir fanden also die Vermutung nicht bestätigt, daß Patienten mit leukämischen Zellen im Blut (bei Diagnose oder im Rezidiv) schlechter reagieren als Patienten ohne leukämische Blasten. Das gleiche gilt für die Lymphotoxinbildung (Tab. 3.4.2.c.).

Bemerkenswert erscheint uns jedoch die prozentual unterschiedliche Verteilung der Patienten auf die Gruppen der Lymphoproliferation und Lymphotoxinbildung (Tab. 3.4.2.d.). In den Normbereich der Lymphoproliferation fielen doppelt so viele Patienten als in den Normbereich der Lymphotoxinbildung.

Tab.3.4.2.a: Lymphozytenfunktion bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL)

| Name | Alter bei Diagnose (Mon.) | Alter bei Ly-Untersuchung (Mon.) | Δ (Mon.) | Gruppe LyP | Gruppe LT | Therapie |
|---|---|---|---|---|---|---|
| St.A. | 55 | 74 | 19 | C | + | 4 |
| L.B. | 167 | 184 | 19 | C | - | 4 |
| B.B. | 51 | 59 | 28 | C | - | 5 |
| B.K. | 52 | 94 | 38 | C | - | 6 |
| B.U. | 96 | 96 | 0 | C | - | 1 |
| W.B. | 88 | 88 | 0 | C | - | 1 |
| St.E. | 161 | 189 | 28 | C | - | 5 |
| N.D. | 52 | 85 | 32 | C | - | 5 |
| Sch.D. | 42 | 47 | 5 | B | + | 4 |
| K.H. | 71 | 74 | 3 | B | - | 4 |
| F.Th. | 78 | 79 | 1 | B | (+) | 2 |
| H.G. | 41 | 68 | 27 | B | (+) | 5 |
| M.M. | 61 | 62 | 1 | B | - | 2 |
| P.C. | 52 | 55 | 3 | B | - | 4 |
| H.R. | 159 | 162 | 3 | A | + | 4 |
| R.A. | 112 | 116 | 4 | A | + | 4 |
| H.A. | 108 | 158 | 50 | A | (+) | 5 |
| N.M. | 105 | 134 | 29 | A | (+) | 5 |
| H.E. | 32 | 41 | 9 | A | (+) | 5 |
| N.J. | 65 | 115 | 50 | A | - | 5 |
| B.S. | 182 | 184 | 2 | A | + | 3 |
| F.M. | 70 | 70 | 0 | A | + | 1 |
| R.S. | 48 | 98 | 50 | A | - | 5 |
| S.J. | 161 | 161 | 0 | A | (+) | 1 |
| B.A. | 118 | 133 | 15 | $A_{1+2}$ | + | 4 |
| F.E.M. | 163 | 163 | 0 | $A_{1+2}$ | (+) | 1 |
| B.V. | 117 | 117 | 0 | $A_{1+2}$ | (+) | 1 |
| O.B. | 69 | 112 | 43 | $A_{1+2}$ | - | 5 |
| F.M. | 35 | 44 | 9 | $A_{1+2}$ | - | 4 |
| H.T. | 32 | 42 | 10 | $A_{1+2}$ | - | 4 |
| Sch.Ch. | 174 | 177 | 3 | $A_{1+2}$ | - | 4 |
| B.H. | 134 | 134 | 0 | $A_{1+2}$ | + | 1 |
| B.G. | 179 | 179 | 0 | $A_{1+2}$ | + | 1 |
| H.P. | 142 | 142 | 0 | $A_{1+2}$ | + | 1 |

Tab. 3.4.2.b: Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Therapiestadium bei ALL

| Therapie-Stadium / LyP-Gruppe | Gesamtzahl n=34 (100%) | $A_{1+2}$ n=10 (29%) | | A n=10 (29%) | | B n=6 (18%) | | C n=8 (24%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| bei Diagnose | | 5 | (50%) | 2 | (20%) | 0 | ( 0%) | 2 | (25%) |
| bei Induktion | | 0 | ( 0%) | 0 | ( 0%) | 2 | (33%) | 0 | ( 0%) |
| bei Bestrahlung | | 0 | ( 0%) | 1 | (10%) | 0 | ( 0%) | 0 | ( 0%) |
| bei Erhaltungstherapie | | 4 | (40%) | 3 | (30%) | 3 | (50%) | 2 | (25%) |
| nach Absetzen | | 1 | (10%) | 4 | (40%) | 1 | (17%) | 3 | (38%) |
| bei Rezidiv | | 0 | ( 0%) | 0 | ( 0%) | 0 | ( 0%) | 1 | (12%) |

Definition von Normbereichen siehe Kapitel 3.2.6.

Tab. 3.4.2.c Lymphotoxinbildung in Abhängigkeit vom Therapiestadium bei ALL

| Therapiestadium | LT-Gruppe | + | | (+) | | - | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gesamtzahl n=34 | (100 %) | n=10 | (29%) | n=8 | (24%) | n=16 | (47%) |
| bei Diagnose | | 4 | (40%) | 3 | (38%) | 2 | (12%) |
| bei Induktion | | 0 | ( 0%) | 1 | (12%) | 1 | ( 6%) |
| bei Bestrahlung | | 1 | (10%) | 0 | ( 0%) | 0 | ( 0%) |
| bei Erhaltungstherapie | | 5 | (50%) | 1 | (12%) | 6 | (38%) |
| nach Absetzen | | 0 | ( 0%) | 3 | (38%) | 6 | (38%) |
| bei Rezidiv | | 0 | ( 0%) | 0 | ( 0%) | 1 | ( 6%) |

Lymphotoxinaktivität (LT):

| | | |
|---|---|---|
| Normbereich | + | Hemmung > 20 % |
| Grenzbereich | (+) | Hemmung zwischen 1 und 20 % |
| Negativbereich | - | keine Hemmung |

Tab. 3.4.2.d.

Lymphoproliferation und Lymphotoxinbildung
(34 Patienten mit ALL)

| Lympho-proliferation | A | B | C |
|---|---|---|---|
| Häufigkeit in % | 58 | 18 | 24 |
| Lymphotoxin-bildung | + | (+) | - |
| Häufigkeit in % | 29 | 24 | 47 |

Definition der Normbereiche siehe Kap. 3.2.6.

Auf den Grenzbereich der Lymphoproliferation (Gruppe B) und der Lymphotoxinbildung (Gruppe (+)) entfallen jeweils annähernd gleich viele Patienten. (Vgl.Tab. 3.4.2.b und 3.4.2.c.).
Die Patienten in Gruppe C sind auch alle bis auf einen in der Negativgruppe der Lymphotoxinsekretion (Gruppe-) enthalten. (Vgl. Tab. 3.4.2.a.).
In dieser Negativgruppe der Lymphotoxinsekretion finden wir aber auch 6 Patienten der Gruppe A bzw. $A_{1+2}$, deren Lymphozyten entweder unter Erhaltungstherapie oder nach Absetzen der Therapie untersucht wurden. (Vgl. Tab. 3.4.2.a.).
Diese Befunde zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung (ca. 9o %) im Negativbereich der Lymphoproliferation und Lymphotoxinbildung. Im Positivbereich der Lymphozytenfunktion von Patienten mit ALL scheint die Lymphotoxinbildung möglicherweise der empfindlichere Parameter zu sein.

Bei der in dieser Untersuchung zahlenmäßig am stärksten vertretenen Patientengruppe, den Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL), fallen in den Normbereich 65 % (n=22), den Grenzbereich 14 % (n=5) und in den Negativbereich 21 % (n=7). Zwei der 7 Kinder in Gruppe C (Negativgruppe) wurden bei Diagnosestellung, eines bei Erhaltungstherapie, drei nach Absetzen der Behandlung und eines im Rezidiv untersucht.

Tab. 3.4.2.e Therapiestadien der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)

| Therapie-stadium | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | n |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Normbereiche | | | | | | | |
| A | 7 | 0 | 1 | 9 | 5 | 0 | 22 |
| B | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 5 |
| C | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 7 |

Therapiestadien der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)

1 bei Diagnose
2 bei Induktion
3 bei Bestrahlung
4 unter Erhaltungstherapie
5 nach Absetzen
6 bei Rezidiv

Wir fanden bei den Patienten mit ALL keine signifikante Häufung in einem Therapiestadium.
Die Reaktion auf das Antigen-Gemisch war insgesamt jedoch deutlich schwächer als bei der Summe aller Patienten (Tab. 5.5.).

Tab. 3.4.2.f

Lymphoproliferation und Lymphotoxinbildung bei Patienten und Kindern mit ALL

| | Patienten | Kindern mit ALL |
|---|---|---|
| Normbereich | 70 % | 65 % |
| Grenzbereich | 24 % | 14 % |
| Negativbereich | 6 % | 21 % |

Definition der Normbereiche siehe Kapitel 3.2.6.

## Diskussion

Ziele der Arbeit:
In dieser Arbeit wurde eine standardisierte Antigen-Mischpräparation mit den Komponenten Tetanus-Toxoid, Tuberkulin GT, Streptolysin 0, Vaccinia- und Mumps-Antigen auf ihre Anwendbarkeit in der zellulären Immundiagnostik beim Menschen untersucht. Die Gründe, die uns zu dieser Untersuchung veranlaßten, waren folgende:

1.) Die Stimulation von Lymphozyten mit Lektinen zur Ermittlung der Immunkompetenz eines Individuums ist dadurch erschwert, daß auch bei - mit anderen Methoden nachweisbaren - ausgeprägten Immunstörungen noch positive Reaktionen nachweisbar sind und deshalb die Grenze zwischen normaler und pathologischer Reaktion nicht exakt festgelegt werden kann. Wir erwarteten, durch Stimulation der Lymphozyten mit spezifischen Antigenen eine deutlichere Abgrenzung zwischen normalen und pathologischen Werten zu erreichen.

2.) Im Gegensatz zu den Lektinen können Lymphozyten auf eine Antigen-Stimulation nur reagieren, wenn der Spender zuvor gegen das betreffende Antigen sensibilisiert wurde. Ein Ausbleiben der Reaktion kann deshalb entweder Zeichen einer Immunstörung oder Hinweis auf eine (noch) fehlende oder zu schwache Sensibilisierung sein. Bei Verwendung eines Antigen-Gemisches mit fünf verschiedenen Komponenten hofften wir die Wahrscheinlichkeit einer fehlenden Sensibilisierung als Ursache für eine A-Reaktivität gering zu halten, da die Sensibilisierung gegen eine der Antigen-Komponenten bereits ausreicht, um eine meßbare Reaktion zu erhalten.

3.) Bei immunsupprimierten Patienten und bei Patienten mit Immundefizienzen ist häufig die niedrige Lymphozytenzahl im Blut ein limitierender Faktor in der zellulären Immundiagnostik. Für klinische Untersuchungen, insbesondere in der Pädiatrie, ist deshalb jede Methode, die eine Einsparung von Zellen ermöglicht, von großem Wert. Bei Verwendung eines Antigen-Gemisches zur Lymphozyten-Stimulation anstelle einer Vielzahl von Einzel-Antigenen (in unseren Untersuchungen wären es fünf) lassen sich etwa 80 % der Ansätze (und damit der Lymphozyten) einsparen.

4.) Zusätzlich zur Lymphoproliferation ist es heute möglich, die Reaktivität von Lymphozyten durch Messung der Lymphokine-Sekretion zu bestimmen. Mit Hilfe einer Mikromethode, die es erlaubt eines der Lymphokine - das Lymphotoxin - aus einer großen Zahl von Proben semiquantitativ zu bestimmen, haben wir deshalb in dieser Arbeit neben der durch das Antigen-Gemisch induzierten Lymphoproliferation als zweiten Parameter der Reaktivität der Lymphozyten in vitro, die Lymphotoxin-Sekretion bestimmt und die beiden Parameter verglichen.

Besonderheiten der Versuchsauswertung

Obwohl die induzierte Lymphoproliferation nach Stimulation mit Lektinen bereits vor 20 Jahren (Powell 1960) und die mit spezifischen Antigenen vor 18 Jahren (Pearmain et al. 1963) erstmals beschrieben wurden, gibt es bis heute noch kein allgemein anerkanntes Verfahren, um die Reaktivität der Zellen, gemessen als Inkorporation von radioaktiv-markiertem (3H-)Thymidin in die DNS der Zellen, zu errechnen. Theoretisch gibt es zwei Möglichkeiten:

1.) die Berechnung des Stimulations-Indexes und
2.) die Berechnung der Stimulations-Differenz. Osa und Weksler (1977) fanden bei Verwendung der Stimulations-Differenz als Auswertungskriterium eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.
Beide Verfahren versagen jedoch (s. Kapitel 3.2.3.), wenn der Bezugs- oder Kontrollwert (3H-Thymidin-Aufnahme der unstimulierten Kontrollkultur) extrem hoch oder extrem niedrig ist.

Wir haben deshalb bei der Auswertung der Untersuchungsergebnisse versucht, beide Verfahren zu berücksichtigen und gleichzeitig einen weiteren Parameter der Lymphozyten-Reaktivität, die Lymphotoxin-Sekretion, miteinzubeziehen.

Definition der Normbereiche

Lymphozyten von 126 klinisch gesunden Probanden wurden auf ihre in vitro Reaktion nach Stimulation mit dem Antigen-Gemisch untersucht. 114 (entsprechend 90 %) der Probanden erreichten einen Stimulations-Index von über 10 oder eine Stimulations-Differenz von über 10.000 cpm (Bereich $A_{1+2}$); 85 (entsprechend 67 %) der Probanden erreichten einen Stimulations-Index von über 10 und eine Stimulations-Differenz von über 10.000 cpm (Bereich A).

Da es sich bei allen 126 Probanden um klinisch gesunde Personen handelte, erschien es uns nicht gerechtfertigt, den "Normbereich" zu eng zu definieren und z. B. als Normbereich den Bereich A zu fordern; mit einer solch engen Definition wären 33 % (100-67) der gesunden Probanden aus dem Normbereich gefallen. Wir haben deshalb als Normbereich den Bereich $A_{1+2}$ festgelegt. Nach dieser Definition fallen nur 10 % aus dem Normbereich.

Unter den Probanden, die im Normbereich einen Stimulations-Index über 10 oder eine Stimulations-Differenz über 10.000 nicht erreichten (23 %), also außerhalb des Bereiches A lagen, wurde eine Stimulationsdifferenz unter 10.000 21 mal (17 %), ein Stimulations-Index unter 10 dagegen nur 8 mal (6 %) beobachtet. Das bedeutet, daß in dieser Gruppe der geforderte Stimulations-Index etwa 3 mal häufiger erreicht wurde, als die alternativ geforderte Stimulations-Differenz.

Beurteilen wir nun die Ergebnisse unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Lymphotoxin-Aktivität, so finden wir in der Gruppe A der gesunden Probanden (n=85) 8 mit fehlender Lymphotoxin-Aktivität.

Im Normbereich $A_{1+2}$ zeigten alle Probanden mit einer Stimulations-Differenz über 10.000 cpm (n=8) eine gute Lymphotoxin-Bildung. Die Probanden dieses Normbereichs mit Stimulations-Index über 10 (n=21) zeigten jedoch in vier Fällen keine Lymphotoxin-Bildung. Das bedeutet, daß eine fehlende

Lymphotoxin-Bildung bei einer Stimulations-Differenz über 10.000 cpm weniger, bei einem Stimulations-Index über 10 eher vorkommen kann. Eine gute Lymphotoxinbildung korreliert also besser mit einer hohen Stimulations-Differenz als mit einem hohen Stimulations-Index.
Insgesamt gibt also die Stimulations-Differenz über 10.000 cpm eine stärkere Reaktivität der Lymphozyten an.

Wie verhalten sich nun Stimulations-Index und Stimulations-Differenz bei den gesunden Probanden außerhalb der oben definierten Normbereiche?

Außerhalb des Normbereichs $A_{1+2}$ liegen die Werte von 12 (10 %) der 126 Probanden. Von diesen zeigten drei keine Reaktion der Lymphozyten (Lymphozyten-Proliferation), weitere drei eine schwache Reaktion (Stimulations-Index zwischen 1 und 2 und Stimulationsdifferenz bis 500 cpm) und sechs eine Reaktion mit einem Stimulations-Index zwischen 2 und 10 und einer Stimulations-Differenz bis zu 5000 cpm. Da alle 12 Probanden, insbesondere auch die drei nicht-reagierenden klinisch gesund waren, sind wir nicht berechtigt, diese Werte als pathologisch zu definieren. Wir bezeichnen deshalb - sozusagen wertfrei - als Grenzbereich der induzierten Lympho-Proliferation eine schwache Reaktion mit Stimulations-Index zwischen 1 und 10 und Stimulations-Differenz zwischen 1 und 10.000 cpm; eine solche Reaktion wurde bei 9 Probanden (8%) beobachtet. Als Negativbereich definieren wir eine völlig fehlende Reaktion; sie war bei drei Probanden (2 %) zu beobachten.
Berücksichtigen wir gleichzeitig die Lymphotoxin-Sekretion der Lymphozyten der Probanden dieser Bereiche, so finden wir keineswegs die zunächst erwartete Zunahme der Zahl von Lymphotoxin-Negativen: Von den 9 Probanden des Grenzbereichs reagierten nur zwei mit schwacher bzw. fehlender Lymphotoxinaktivität (2/9). Die entsprechenden Zahlen des Normbereichs

waren 10/114. Selbst im Negativ-Bereich (n=3) reagierte trotz völlig fehlender Lymphoproliferation noch ein Proband mit Lymphotoxin-Sekretion.

Insgesamt war die Lymphotoxin-Sekretion bei 16 Probanden negativ. Diese Probanden sind jedoch - wie eben beschrieben - nicht unbedingt identisch mit denen mit verminderter Lymphoproliferation.
Fassen wir die Lymphotoxin-Sekretion als gleichwertigen Parameter neben der Lymphoproliferation auf, so ergibt sich für die Verteilung der Probanden in den drei Bereichen (Negativ-Bereich, Grenz-Bereich, Norm-Bereich) folgende Verteilung:
In den Negativ-Bereich fallen nur 2 von 126, d. h. weniger als 2 % der Probanden, die Zahl der Probanden im Grenzbereich vermindert sich dann auf 4 und in den Normalbereich fallen 95 % aller Probanden. Dieser Normalbereich ist dann definiert als Stimulations-Index über 10 oder Stimulations-Differenz über 10.000 oder Lymphotoxin-Aktivität über 20 % Hemmung. Die Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Lymphozyten eines gesunden Probanden auf das Antigen-Gemisch überhaupt reagieren beträgt demnach über 98 % (ohne Berücksichtigung von Lymphotoxin 97 %) und die Wahrscheinlichkeit, daß die Reaktion im Normbereich liegt beträgt 95 % (ohne Berücksichtigung von Lymphotoxin 90 %).

Problematik der Mehrfach-Stimulation

Die Lymphozyten-Stimulation führt zu zwei Reaktionen (Schellekens and Eijsvoogel, 1971):

a) die gegen das Antigen sensibilisierten Lymphozyten reagieren auf die Stimulation mit Proliferation und
b) die reagierenden Zellen "rekrutieren" nicht-sensibilisierte Zellen ebenfalls zur Proliferation.

Beide Vorgänge haben zur Folge, daß ein Maximum der Reaktion in jeder Kultur nicht überschritten werden kann; dann nämlich, wenn annähernd alle Zellen (die direkt und die durch die Rekrutierung stimulierten) mit Proliferation reagieren. Die so bedingte Maximal-Reaktion erklärt, weshalb z. B. Hirschhornand Ripp, (1965) nach Vielfach-Stimulation wohl eine Zunahme, jedoch keine additive Zunahme fanden: Lymphozyten einer gegen vier Antigene sensibilisierten Person zeigten keine Summation der Reaktion, wenn sie mit den vier Antigenen simültan anstatt getrennt stimuliert wurden.

Bei eigenen Untersuchungen (Kap. 3.3.) fanden wir nach Stimulation mit optimalen Dosen des Antigen-Gemisches III ebenfalls eine Zunahme der Reaktion, ohne jedoch eine additive Wirkung zu erzielen (Untersuchung von drei der fünf Einzelkomponenten des Antigen-Gemisches). Ein Proband (PR) erreichte bereits nach Stimulation mit Tetanus Toxoid höhere Lymphoproliferationswerte als bei Verwendung des Antigen-Gemisches.

Andererseits konnten Leguit et.al. (1973) tatsächlich eine Summation der Reaktion nachweisen, wenn sie zur Stimulation mit dem Antigen-Gemisch jeweils suboptimale Dosen verwendeten.

Für die Fragestellung dieser Arbeit ist es letztlich nicht wichtig, ob durch das Misch-Antigen eine Summation, Addition oder auch Potenzierung der Reaktion auftritt, da wir bei klinischen Studien eher nach schwacher oder fehlender Reaktivität der Patienten-Lymphozyten suchen.

Stimulierte Lymphozyten sezernieren nach Stimulation nicht nur Faktoren, die eine Rekrutierung anderer Lymphozyten bewirken, sondern auch Lymphotoxin und Interferone mit antiproliferativer Wirkung. Die Wirkung äußert sich darin, daß potentiell zur Proliferation fähige Lymphozyten in Anwesenheit dieser Faktoren nicht oder nur vermindert zur Proliferation stimuliert werden können (Lindahl/Magnussen et.al. 1972; Blomgren et.al. 1974).
Eine solche Reaktion könnte bei Multi-Stimulation zu einer gegenseitigen Suppression der Lymphoproliferation der verschiedenen Zellclone führen.

Die Verwendung eines Misch-Antigens zur Lymphozyten-Stimulation ist selbstverständlich nur sinnvoll, wenn aus der Multi-Stimulation der Zellen keine falsch negativen Ergebnisse resultieren.

In vergleichenden Einzel- und Zweifach-Stimulationen (Tetanus-Toxoid und Vaccinia) von Lymphozyten fand Caron (1977) tatsächlich eine Verminderung der 3H-Thymidin-Aufnahme in den Zweifach-stimulierten Kulturen. Solange die Einzelkomponenten jedoch eine Proliferation induzierten, blieb immer in den Zweifach-stimulierten Kulturen eine Reaktion (wenn auch eine abgeschwächte) messbar. Für unsere Studien bedeutet dies, daß solange sichergestellt ist, daß die Einzelkomponenten der Antigen-Charge in Konzentrationen verwendet werden, die eine Stimulation erlauben, für das Misch-Antigen keine völlige Suppression der Reaktion zu erwarten ist.

Untersuchungen an Patienten

Bei diesen Untersuchungen ging es uns zunächst weniger um eine detaillierte Untersuchung von Patienten mit ein-und derselben Erkrankung, als vielmehr um Hinweise dafür, ob bei Patienten mit immunologischen, oder auch nicht immunologischen Erkrankungen überhaupt Störungen der Reaktivität auf eine Antigen-Stimulation nachweisbar sind.

Ausgehend von der Erwachsenen-Kontrollgruppe mußten wir damit rechnen, daß maximal 2 % aller Patienten im Negativ-Bereich und maximal 4 % im Grenzbereich liegen.
Da die überwiegende Zahl der Patienten Kinder, meistens Kleinkinder und Schulkinder waren, mußten wir zusätzlich die Reaktivität der Lymphozyten bei Kindern berücksichtigen.
Hier ergab sich jedoch, daß in der Kinder-Kontrollgruppe nur Werte im Normbereich und im Gegensatz zur Erwachsenen-Kontrollgruppe keine Werte im Grenz- und Negativbereich gefunden wurden. Für die Untersuchungen an den Patienten(Kinder) bedeutet das, daß alle Werte außerhalb des Normbereichs als auffällig gelten müssen.
Tatsächlich lag in der Patientengruppe sowohl der Anteil nicht reagierender Probanden mit n=7 (6 %) höher als in der Erwachsenen-Kontrollgruppe n=2 (1,5 %) und der Kinder-Kontrollgruppe (0 %), wie auch der Anteil schwach reagierender Probanden mit n=27 (24 %) höher als in der Erwachsenen-Kontrollgruppe n=4 (3 %) und der Kinder-Kontrollgruppe (0 %).

Keine Reaktion auf das Antigen-Gemisch fanden wir bei sieben Patienten mit ALL (20 %),einem (9 %) mit rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten, zwei (33 %) mit Morbus Hodgkin und einem (12,5 %) mit Wilms' Tumor.
Eine schwache Reaktion auf das Antigen-Gemisch fanden wir bei einigen Patienten mit Zöliakie, mit AML, mit ALL, mit SSPE, mit rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten, mit Thrombozytopenie, mit Wilms' Tumor, mit Autoimmunerkrankung, mit Down Syndrom, mit Lymphosarkom, mit Morbus Bruton, mit progressiv zellulärem Immundefekt, mit Granulom und mit nephrotischem

Syndrom.
Keine Störung der Reaktivität fanden wir bei Patienten mit CML, Morbus Crohn, mit Pneumonie, mit rezidivierenden Hautabszessen und aplastischer Anämie.
Für eine weitere Auswertung sind die einzelnen Gruppen der Patienten zu klein. Diese Befunde können nur Hinweise auf mögliche Störungen der Lymphozytenfunktion bei bestimmten Diagnosen im Hinblick auf spätere Untersuchungen geben.

Besonders wichtig erscheint uns, daß die Reaktion auch auf das Antigen-Gemisch die zelluläre (thymusabhängige) Immunreaktivität reflektiert und daß Störungen der humoralen Immunität nicht mit Störungen der Antigen Reaktivität einhergehen: Patienten mit Agammaglobulinämie reagieren auf das Antigen-Gemisch, während der Patient mit einem kombinierten Immundefekt nicht reagiert.

Wir können also davon ausgehen, daß auch für das Antigen-Gemisch gilt, daß die induzierte Lymphozyten-Proliferation eine spezifische Reaktion ist, die eng mit dem zellulären Immunstatus des jeweiligen Patienten korreliert, wie dies für Einzelantigene bereits früher beschrieben wurde.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befaßt sich mit in vitro Reaktionen menschlicher Lymphozyten nach Stimulation mit einem Antigen-Gemisch, bestehend aus Tuberkulin GT, Tetanus Toxoid, Mumps Antigen, Vaccinia Antigen und Streptolysin O. Es wurde sowohl die induzierte Lymphozyten-Blastentransformation, als auch die Lymphotoxinbildung nach einer von EIFE und Mitarbeitern veröffentlichten Methode (EIFE und AUGUST, 1973; EIFE et.al., 1974) bestimmt.

Zunächst untersuchten wir die Reaktion bei einer Gruppe gesunder Erwachsener (n=126) und fanden 95 % der Untersuchten im Norm-, 3,5 % im Grenz- und 1,5 % im Negativbereich der Blastentransformation und Lymphotoxinsekretion.

Bei einer Gruppe gesunder Kinder lagen, bei gleichen Bewertungskriterien, 100 % (n=24) der Untersuchten im Normbereich.

Das Antigen-Gemisch sprach also in der verwendeten Konzentration in über 98 % der gesunden Erwachsenen und bei allen gesunden Kindern an.

Bei den Patienten (n=112) mit und teilweise ohne immunologische Erkrankung lagen 70 % im Norm-, 24 % im Grenz- und 7 % im Negativbereich.

Der Anteil nicht oder schwächer reagierender Probanden lag in der Patientengruppe also deutlich höher als in der Erwachsenen- oder Kinderkontrollgruppe. Das bedeutet, daß alle Werte außerhalb des Normbereiches bei den Patienten als auffällig gelten müssen.

Diese Befunde können jedoch nur einen Hinweis auf mögliche Störungen der Lymphozytenfunktion bei bestimmten Diagnosen geben.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

BLOMGREN, H.:
Studies on the proliferation and immunological competence of mouse thymic cells.
1 BL. S. 32, Red. Diss. Stockholm, 1972

CARON, G.A.:
The effect of antigens in combination on lymphocyte transformation in vitro.
Int. Arch. Allergy 31, 521-528, 1967

DiGEORGE, A.M.:
Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences: Concurrence with congenital hypoparathyreoidism. Immunologic Defiency Disease in Man.
In Birth Defects: Orig. Art. Ser. IV, 1: 116-121, 1968

EIFE, R. and AUGUST, C.:
Detection of lymphotoxin produced in mixed lymphocyte cultures (MLC): Variation of target cell sensitivity.
Cell. Immunol. 9: 163-168, 1973

EIFE, R.; EIFE, G.; AUGUST, C.; KUHRE, W.; STAEHR-JOHANSEN,K.:
Lymphotoxin production and blast cell transformation by cord blast lymphocytes: Dissociated function in newborn infants.
Cell. Immunol. 14: 435-442, 1974

HIRSCHHORN, K.; BACH, F.; KOLODNY, R.L.; FIRSCHEIN, I.L.:
Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro.
Science, 142, 1185, 1963

HIRSCHHORN, K. and RIPPS, C.S.:
Lymphocyte interaction in vitro. Isoantigens and cell interactions.
S. 57, Wistar Institute Press., 1965

LEGUIT, P.; ANNEKE MEINESZ, LOEKIE HUISMANS and EIJSVOOGEL, V.P.:
The use of an antigen-cocktail in the lymphocyte transformation test
Clin. exp. Immunol. 14, 149-152, 1973

LINDAHL-MAGNUSSON, P.; LEARY, P.; GRESSER, I.:
Interferon inhibits DNA Synthesis induced in mouse lymphocyte Suspension by Phytohaemagglutinin or by Allogenic cells.
Nature New Biology V. 237, 120-121, 1972

LING, N.R.; HUSBAND, E.M.:
Specific and non-specific stimulation of peripheral lymphocytes.
Lancet, i., 363, 1964

LING, N.R. and KAY, J.E.:
Lymphocyte stimulation.
North-Holland, Publishing Company, Amsterdam, 1975

MIHALCU, F.; STEFANESCU, M.; PLATICA, C.:
The blastic transformation of human lymphocytes induced by streptococcal antigens.
Arch. Ronm. PATH. EXP. MICROBIOL.; 34, 121-123, 1975

OPPENHEIM, J. J.; ROSENSTREICH, D.L.:
Mitogens in Immunobiology,
Academic Press, Inc., New York, 1976

OPPENHEIM, J.J.; WOLSTENCROFT, R.A.; GELL, P.G.H.:
Delayed hypersensitivity in the guinea-pig to a protein-hapten conjugate and its relationship to in vitro transformation of the lymph node, spleen, thymus and peripheral blood lymphocytes.
Immunology, 17, 89, 1967

OSA, S.R. and WEKSLER, M.E.:
Demonstration of Significant Differences in the Proliferation capacity of lymphocytes from Normal Human Subjects.
Cellular Immunol.32, 391-399, 1977

PEARMAIN, G.; LYCETTE, R.R.; FITZERALD, P.H.:
Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes.
Lancet, i., 637, 1963

SCHELLKENS, P.Th.A.; EIJSVOOGEL, V.P.:
Lymphocyte transformation in vitro. I. Tissue culture conditions and quantitative measurements.
Clin. exp. Immunol. 31, 571, 1968

SCHELLKENS, P.Th.A.; EIJSVOOGEL, V.P.:
Lymphocyte transformation in vitro. III. Mechanism of stimulation in the MLC.
Clin. exp. Immunol. 7, S. 229, 1970

SCHELLKENS, P.Th.A.; EIJSVOOGEL, V.P.:
Lymphocyte transformation in vitro.
IV. Recvuitement in antigen-stimulated cultures.
Clin. exp. Immunol. 8, S. 187-194, 1971

# L E B E N S L A U F

Heinrich Tittus, geboren am 23.3.1951 in Marktleugast/Ofr.

| | |
|---|---|
| 1958 - 1963 | Volksschule in Marktleugast/Ofr. |
| 1963 - 1967 | Klösterliche Knabenrealschule in Plankstetten/Opf. |
| 1967 - 1968 | Städt. Friedrich List Wirtschaftsaufbauschule München (Übertrittsklasse) |
| 1968 - 1971 | Städt. Adolf Weber Gymnasium München |
| 1971 | Abitur |
| 1971 - 1973 | Studium der Physik und Philosophie |
| 1973 - 1979 | Studium der Medizin an der LMU - München |
| 1975 | Ärztliche Vorprüfung |
| 1976 | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 1978 | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 1979 | Praktisches Jahr |
| | Innere Medizin - I. Medizin. Klinik Großhadern |
| | Chirurgie - Städt. Krankenhaus Augsburg |
| | Gynäkologie - I. Universitäts-Frauenklinik München |
| 1979 | 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 1979 - 1981 | Wiss. Ass. am Institut für Anästhesie im Klinikum Großhadern |
| Ab Mai 1981 | Assistenzarzt an der II. Medizin. Klinik des Krankenhauses München Schwabing |